UNIVERSITÉ DE DIJON

THÈSE

PRÉSENTÉE

À LA FACULTÉ DES SCIENCES DE LA VIE ET DE L'ENVIRONNEMENT

EN VUE D'OBTENIR LE DIPLÔME DE

DOCTEUR - INGENIEUR

PAR

JEAN QUDOT

INGÉNIEUR E.S.I.T.P.A.

LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE DE L'I.B.A.N.A.

LABORATOIRE DE CRYPTOGAMIE DU M.N.H.N.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA DÉGRADATION BACTÉRIENNE DES HYDROCARBURES

PRODUITS ET FACTEURS SUSCEPTIBLES DE MODIFIER LA CINÉTIQUE DU PHÉNOMÈNE

SOUTENUE LE 28 FÉVRIER 1975

JURY : MM. J. KEILLING — PRÉSIDENT

C. BARON, P. FUSEY — EXAMINATEURS

V. CAUMARTIN — RAPPORTEUR

N°C.N.R.S. A.O. 11 008

UNIVERSITÉ DE DIJON

THÈSE

PRÉSENTÉE

À LA FACULTÉ DES SCIENCES DE LA VIE ET DE L'ENVIRONNEMENT

EN VUE D'OBTENIR LE DIPLÔME DE

DOCTEUR - INGENIEUR

PAR

JEAN OUDOT

INGÉNIEUR E.S.I.T.P.A.

LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE DE L'I.B.A.N.A.

LABORATOIRE DE CRYPTOGAMIE DU M.N.H.N.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA DÉGRADATION BACTÉRIENNE DES HYDROCARBURES

PRODUITS ET FACTEURS SUSCEPTIBLES DE MODIFIER LA CINÉTIQUE DU PHÉNOMÈNE

SOUTENUE LE 28 FÉVRIER 1975

JURY : MM. J. KEILLING — PRÉSIDENT

C. BARON — EXAMINATEURS

P. FUSEY — EXAMINATEURS

V. CAUMARTIN — RAPPORTEUR

N°C.N.R.S.

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

RESUME

Le rôle des microorganismes dans l'épuration biologique d'eaux et de sols pollués par des hydrocarbures est bien établi.

Dans cette étude, on a cherché à déterminer les conditions optimales de la biodégradation.

A cet effet, on a étudié l'action, en cultures mixtes, de souches bactériennes adaptées à la dégradation des hydrocarbures. Ces souches ont été sélectionnées à partir de sols pollués.

Une série d'expériences, menées au laboratoire, a permis de mettre en évidence l'action de produits élaborés pour accélérer la biodégradation (F72 et S320). Ces produits ont une action favorable.

On a également étudié l'influence de facteurs physico-chimiques sur la biodégradation d'un pétrole brut de Kuweit : agitation, aération, composition du milieu de culture, température et pH.

Des expériences sur le sol ont confirmé les résultats observés au laboratoire.

On a étudié l'évolution de la microflore sur divers sols pollués, ainsi que l'influence d'un épandage d'hydrocarbures sur le développement de la flore phanérogamique.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546819_0017

J'adresse tous mes remerciements à Monsieur CAUMARTIN, Professeur de Microbiologie à l'I.B.A.N.A., qui a accepté de diriger cette thèse, ainsi qu'à Monsieur FUSEY, Chef du Département de Protection des Matériaux au M.N.H.N., qui m'a permis de mener à bien mes travaux par ses conseils.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Monsieur le Professeur RIVIERE, pour avoir bien voulu m'accueillir au Laboratoire de Microbiologie de l'I.N.A.

Monsieur KEILLING, Directeur de l'I.B.A.N.A., Professeur à l'I.N.A., m'a fait l'honneur d'accepter de présider le Jury de cette thèse. Qu'il trouve ici l'expression de mes respectueux remerciements.

Je remercie Monsieur BARON, Professeur de Biochimie à la Faculté des Sciences de la Vie et de l'Environnement et à l'I.B.A.N.A., ainsi que MM. CAUMARTIN et FUSEY qui ont bien voulu juger ce travail.

J'exprime mon amicale reconnaissance à tous ceux qui m'ont aidé dans la réalisation de cet ouvrage.

SOMMAIRE

		page
1.	INTRODUCTION	1
2.	LES MICROORGANISMES UTILISANT LES HYDROCARBURES	4
2.1.	CONSIDERATIONS SUR L'UTILISATION DES HYDROCARBURES PAR LES MICROORGANISMES.	
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	4
2.1.1	Les microorganismes du sol	4
2.1.2.	Généralités sur la biodégradation des hydrocarbures	5
2.1.3	Assimilation des n-alcanes	6
	2.1.3.1 caractères généraux	6
	2.1.3.2 voies métaboliques	6
2.1.4	Assimilation des alcanes ramifiés	9
2.1.5	Assimilation des alcènes	9
2.1.6	Assimilation des cycloparaffines	9
2.1.7	Assimilation des aromatiques	10
	2.1.7.1 Caractères généraux	10
	2.1.7.2 Voies métaboliques	10
2.1.8	Cas particulier des hydrocarbures gazeux	14
2.1.9	Assimilation des asphaltiques	14
2.2.	TECHNIQUES BACTERIOLOGIQUES	15
2.2.1	Dénombrement des bactéries	15
	2.2.1.1 Dénombrement de la microflore totale	15
	2.2.1.2 Dénombrement de la microflore adaptée	17
2.2.2	Isolement des souches adaptées aux hydrocarbures	18
2.2.3	Identification des souches	19
	2.2.3.1 Caractères morphologiques	19
	2.2.3.2 Caractères biochimiques	19
2.2.4	Obtention de souches actives vis-à-vis des hydrocarbures	20
2.3.	ANALYSE DE BACTERIES UTILISANT LES HYDROCARBURES	21
2.3.1	Origine des souches	21
	2.3.1.1. Sol (La Courneuve)	22
	2.3.1.2. Kérosène (Strasbourg)	22
	2.3.1.3. Les inoculums : terres d'Orange et de la Chênaie	22

page

2.3.2 Analyse de la microflore adaptée de la Courneuve 23

2.3.2.1 Résultats 23
2.3.2.2. Interprétation 23

2.3.3 Analyse de la microflore du kérosène 23

2.3.3.1 Résultats 23

2.3.3.2 Interprétation 27

2.3.4. Comparaison de ces deux microflores 27

2.3.5 Analyse des inoculums d'Orange et de la Chênaie 27

2.3.5.1 Protocole expérimental 27

2.3.5.2. Résultats 32

2.3.5.3 Interprétation 32

2.3.6 Discussion des résultats 32

3. TECHNIQUES D'ETUDE ET D'ANALYSE 34

3.1. CONDITIONS EXPERIMENTALES 34

3.1.1 Le matériel 34

3.1.2 Les milieux de culture 35

3.1.3 Les conditions d'incubation 35

3.1.4 Les hydrocarbures employés 36

3.2. TECHNIQUES DE DOSAGE DES HYDROCARBURES CONSOMMES 37

3.2.1 Extraction des hydrocarbures résiduaires 37

3.2.2 Méthodes de dosage 37

3.2.2.1 Méthode spectrophotométrique 37
3.2.2.2 Méthode gravimétrique 38

3.3. UTILISATION STATISTIQUE DES RESULTATS 38

4. EXPERIMENTATION EN MILIEU AQUEUX 40

4.1 INFLUENCE DES PRODUITS F72 et S320 40

4.1.1 Composition chimique des additifs 40

4.1.1.1 S320 40
4.1.1.2 F72 40

4.1.2 Influence de S320, dans un milieu contenant du nitrate d'ammonium 41

4.1.2.1 Protocole expérimental 41
4.1.2.2 Résultats 41
4.1.2.3 Analyse de variance 41
4.1.2.4 Interprétation 43

Page

4.1.3 Influence de F72, dans un milieu avec NO_3NH_4 43
4.1.3.1 Protocole expérimental 43
4.1.3.2 Résultats 43
4.1.3.3 Analyse de variance 43
4.1.3.4 Interprétation 45

4.1.4 Influence de F72 et S320, dans un milieu avec NO_3NH_4 45
4.1.4.1 Protocole expérimental 45
4.1.4.2 Résultats 45
4.1.4.3 Analyse de variance 47
4.1.4.4 Interprétation 47

4.1.5 Influence de F72 et S320, dans un milieu sans NO_3NH_4 47
4.1.5.1 Protocole expérimental 47
4.1.5.2 Résultats 47
4.1.5.3 Analyse de variance 47
4.1.5.4 Interprétation 49

4.1.6 Influence de F72 et S320 dans l'eau de Seine 49
4.1.6.1 Protocole expérimental 50
4.1.6.2 Résultats 50
4.1.6.3 Analyse de variance 50
4.1.6.4. Interprétation 50

4.1.7 Discussion des résultats et conclusions 52

4.2 INFLUENCE DE L'INOCULUM 53

4.2.1 Comparaison des inoculums d'Orange et de la Chênaie 53
4.2.1.1 Protocole expérimental 53
4.2.1.2 Résultats 53
4.2.1.3 Analyse de variance 54
4.2.1.4 Interprétation 54

4.2.2 Comparaison inoculum mixte - inoculum commercial 54
4.2.2.1 Protocole expérimental 54
4.2.2.2 Résultats 55
4.2.2.3 Analyse de variance 55
4.2.2.4 Interprétation 55

4.2.3 Discussion des résultats et conclusions 55

4.3. INFLUENCE DES FACTEURS PHYSICO CHIMIQUES 58

4.3.1 Influence de l'agitation et de l'aération 58
4.3.1.1 Influence de l'agitation 58
4.3.1.2 Influence de l'aération 58
4.3.1.3 Discussion des résultats et conclusions 63

Page

4.3.2 Influence de la composition du milieu de culture 63

4.3.2.1 Protocole expérimental 63
4.3.2.2 Résultats 64
4.3.2.3 Analyse de variance 64
4.3.2.4 Discussion des résultats et conclusions 64

4.3.3 Influence de la température 67

4.3.3.1 Protocole expérimental 67
4.3.3.2 Résultats 76
4.3.3.3 Analyse de variance 76
4.3.3.4 Interprétation 76
4.3.3.5 Discussion des résultats et conclusions 76

4.3.4 Influence du pH 78

4.3.4.1 Protocole expérimental 78
4.3.4.2 Résultats 78
4.3.4.3 Analyse de variance 78
4.3.4.4 Interprétation 78
4.3.4.5 Discussion des résultats et conclusions 79

4.4 CONSIDERATIONS SUR LE TAUX DE BIODEGRADATION 83

4.4.1 Limite de biodégradation d'un pétrole brut 83

4.4.1.1 Protocole expérimental 83
4.4.1.2 Résultats 84
4.4.1.3 Analyse de variance 84
4.4.1.4 Interprétation des résultats et discussion 84

4.4.2 Analyses chromatographiques 85

4.4.2.1 Chromatogrammes 85
4.4.2.2 Conditions d'injection 85
4.4.2.3 Lecture des chromatogrammes 85
4.4.2.4 Interprétation et discussion 85

5. EXPERIMENTATION SUR LE SOL 91

5.1 EVOLUTION DE LA MICROFLORE DANS UN SOL POLLUE PAR DES HYDROCARBURES 91

5.1.1 Auvers-sur-Oise 91

5.1.1.1 Généralités 91
5.1.1.2 Protocole expérimental 92
5.1.1.3 Résultats 92
5.1.1.4 Interprétation 93

5.1.2 La Courneuve 94

5.1.2.1 Généralités 94
5.1.2.2 Protocole expérimental 94
5.1.2.3 Résultats 94
5.1.2.4 Interprétation 94

Page

5.1.3 La Mailleraye 96

5.1.3.1 Généralités 96
5.1.3.2 Protocole expérimental 96
5.1.3.3 Résultats 96
5.1.3.4 Interprétation 103

5.1.4 Discussion des résultats et conclusions 103

5.2. INFLUENCE D'UN EPANDAGE D'HYDROCARBURES SUR LA FLORE PHANEROGAMIQUE 104

5.2.1 Généralités 104

5.2.2 Protocole expérimental 104

5.2.2.1 Identification des plantes 105
5.2.2.2 Dénombrement des plantes 107
5.2.2.3 Hauteur moyenne 107

5.2.3 Résultats 107
5.2.4 Interprétation 107
5.2.5 Discussion des résultats et conclusions 108

6. CONCLUSION GENERALE 109

BIBLIOGRAPHIE 113

1. INTRODUCTION

La croissance exponentielle de l'utilisation des produits pétroliers a multiplié les risques de pollution du milieu naturel par épandage d'hydrocarbures.

Cette nuisance, mis à part les phénomènes naturels de fuite de gisements*, est très généralement liée à la technologie.

En effet, toute rupture de charge au cours du transport, ou de l'utilisation, des hydrocarbures est génératrice de pollution par des déchets pétroliers.

Ce fait est observable à tous les échelons, du tanker géant à l'utilisation domestique.

La majeure partie des hydrocarbures polluants contaminent le domaine maritime, soit directement (déballastage des navires pétroliers) soit par l'intermédiaire des rivières et des fleuves.

La pollution du milieu marin a été très étudiée et ne fait pas l'objet de cette thèse. On pourra, par exemple, consulter à ce sujet les ouvrages de ZOBELL (1940), ainsi que les travaux récents de KLEIN (1968), PILPEL (1968), WARDLEY (1968), ZITKO (1970), BRIDIE (1971), EHRHARDT et BLUMER (1972), ATLAS et BARTHA (1972), REISFELD (1972), SOLI (1973).

La pollution du domaine terrestre peut affecter le sol, les rivières, voire les nappes phréatiques. Nos travaux ont essentiellement porté sur le pouvoir épurateur du sol, avec quelques références à l'eau de Seine.

Les conséquences d'un épandage de produits pétroliers sur le sol sont nombreuses et complexes.

Nous avons délibérément laissé de côté, car cette étude aurait débordé le cadre de notre ouvrage, les modifications éventuelles de la texture et de la structure du sol sous l'influence des hydrocarbures et de leur devenir. Nous ne méconnaissons pas néanmoins l'importance de ces phénomènes, qui ont été étudiés par ailleurs (RAISBECK, 1972).

* KNILL (1970)

Le problème posé est l'élimination des déchets polluants d'hydrocarbures.

On connaît depuis longtemps l'aptitude des microorganismes à utiliser les substrats les plus divers comme source de carbone. Il semblait donc logique d'utiliser le pouvoir anabolique et catabolique de la microflore du sol pour dégrader les hydrocarbures polluants.

Les mécanismes microbiologiques dans le sol sont complexes, et font appel à des microorganismes très différents, dont l'action peut être concomitante ou successive.

Nous avons choisi d'étudier particulièrement des bactéries adaptées à la biodégradation des hydrocarbures,actinomycètes exceptés.

Nous savons néammoins que ceux-ci, ainsi que des levures et des champignons filamenteux, jouent également un rôle dans ce processus.

La physiologie bactérienne nous montre que le développement microbien est lié à de nombreux paramètres.

Les facteurs physico-chimiques : température, pH, aération, éléments du milieu, jouent un rôle que nous avons cherché à préciser.

La nutrition microbienne a des exigences déterminées. Ainsi un milieu de culture doit contenir tous les éléments constitutifs de la cellule : ce sont les besoins élémentaires.

Tableau 1.1

Composition élémentaire des cellules bactériennes (SENEZ, 1968).

Elément	% du poids sec
Carbone	50
Oxygène	20
Azote	14
Hydrogène	8
Phosphore	3
Soufre	1
Potassium	1
Sodium	1
Calcium	0,5
Magnesium	0,5
Chlore	0,5
Fer	0,2
Autres éléments	0,3

On distingue les besoins élémentaires des besoins spécifiques:facteurs de croissance et vitamines,que nous n'avons pas étudiés dans cet ouvrage. on peut par exemple consulter à ce sujet les publications de TSUBOI et coll. (1966),KUSUNOSE et coll.(1967),FUKUI et TANAKA(1968),PERTSOVAYA etEROSHIN (1967).

Ce problème,complexe et encore mal connu,pourra faire l'objet de travaux ultérieurs.

Le but de nos travaux a donc été de chercher à déterminer les conditions optimales de croissance des bactéries dégradant les hydrocarbures, en prenant comme référence, tantôt le nombre de bactéries, tantôt les résultats de la biodégradation (consommation des hydrocarbures). Dans les essais sur l'eau de Seine, on a comparé les deux paramètres.

On a en outre vérifié l'action de deux produits additifs : S 320* et F 72**. Ces deux produits ont été conçus pour apporter l'azote et le phosphore complémentaire au carbone des hydrocarbures.

Le rôle des différents paramètres influant sur le métabolisme des bactéries adaptées a été étudié au laboratoire.

Il nous a fallu d'abord choisir parmi les techniques publiées, et parfois faire les mises au point nécessaires.

Notre but était d'obtenir des valeurs significatives des mesures d'hydrocarbures consommés. C'est pourquoi nous avons réalisé un nombre de répétition suffisant pour chaque expérience, de façon à pouvoir appliquer à nos résultats une analyse de variance (Test F de Fisher).

Parallèlement, nous avons mené une étude sur le sol. Sans être en mesure de définir tous les paramètres, nous avons obtenu des résultats globaux concernant l'évolution de la microflore et de la flore phanérogamique sur les terrains pollués et traités, ou non, à l'aide des additifs F 72 et S 320.

* S 320 : additif à base de produits naturels (vinasse)

** F 72 : produit de synthèse.

2 - LES MICROORGANISMES UTILISANT LES HYDROCARBURES

2. 1. CONSIDERATIONS SUR L'UTILISATION DES HYDROCARBURES PAR LES MICROORGANISMES.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.

On connaît depuis longtemps la faculté que possèdent certains microorganismes d'utiliser des hydrocarbures comme source de carbone et d'énergie. Les premiers travaux dans ce domaine furent effectués par SOHNGEN (1906) et TAUSSON (1925).

Mais cette étude a pris un véritable essor lorsque les microbiologistes joignirent leurs efforts à ceux des techniciens de l'industrie pétrolière. Ainsi, dans les années 1930, c'est un géologue soviétique, G.A. MOGILEVSKII qui pensa à utiliser l'oxydation bactérienne des hydrocarbures comme outil de prospection. Il fut aidé dans ses travaux par le microbiologiste soviétique V.S. BUTKEVICH.

Aux U.S.A., des géologues, intéressés par la prospection de sédiments marins firent appel au microbiologiste C.E. ZOBELL(1940). Les implications de la microbiologie dans la technologie pétrolière devinrent dès lors de plus en plus évidentes.

2.1.1. Les microorganismes du sol.

La population microbienne du sol comprend les bactéries, les actinomycètes, les levures, les champignons filamenteux, dont le rôle dans la dégradation des hydrocarbures est reconnu, ainsi que les algues unicellulaires, les protozoaires et les virus que nous n'avons pas étudié. En effet, leur rôle, mal connu, semble de toute façon être minime dans ce domaine .

Tableau 2. 1.

Population microbienne du sol. Ordre de grandeur (Bactéries, Actinomycètes, Champignons filamenteux).

Microorganismes	Nombre de microorganismes /gramme de terre
Bactéries	$10^8 - 10^9$
Actinomycètes	$10^5 - 10^6$
Champignons filamenteux	$10^4 - 10^6$

2.1.2. Généralités sur la biodégradation des hydrocarbures

En 1906, SÖHNGEN isole des bactéries oxydant le méthane, puis en 1913 signale l'utilisation bactérienne de l'essence et du kérosène. Les souches identifiées appartiennent aux genres Pseudomonas, Micrococcus et Mycobacterium. TAUSZ et PETER, en 1919, isolent des souches de Pseudomonas et un Bacillus qui assimilent les paraffines mais non les hydrocarbures cycliques. GRAY et THORNTON (1928) identifient des souches de Micrococcus, Pseudomonas et Mycobacterium dégradant le naphtalène en milieu minéral liquide.

TAUSSON (1927, 1929), isole en U.R.S.S. à Bakou des bactéries utilisant le naphtalène, le phénantrène, le benzène, le toluène et le xylène. On note également la dégradation de paraffines solides par des champignons (RAHN, 1906; SÖHNGEN, 1913) et par des actinomycètes (BÜTTNER, 1926; HAAG, 1927). Aux U.S.A. les recherches commencent vraiment sous l'influence de STONE (1940), BUSHNELL et HAAS (1941).

Depuis, on considère que tous les hydrocarbures constitutifs du pétrole peuvent être assimilés d'une manière ou d'une autre en aérobiose, par l'un ou l'autre microorganisme (ROZANOVA, 1967).

On pourra se référer à ce sujet aux travaux de KESTER (1961), PERRY (1968), DAVIES et HUGUES (1968),ERTOLA (1969), MIGET et coll. (1969), JOBSON (1972).

En outre, on a observé sous certaines conditions une assimilation anaérobie des hydrocarbures, en particulier par des bactéries sulfato-réductrices (DAVIS, 1967; KURITA et coll., 1971).TRAXLER (1969) a également montré que les nitrates sont réduits en nitrites quand Pseudomonas aeruginosa utilise du n-octane ou du n-octadecane en l'absence d'oxygène moléculaire.

Il existe des bactéries fixatrices de l'azote atmosphérique qui oxydent les hydrocarbures. C'est le cas d'Azotobacter (ARENSHTEIN, 1961) et de plusieurs souches d'Arthrobacter utilisant le n-hexadécane (RIVIERE, OUDOT, GATELLIER, 1974).

Bien que l'on sache qu'une souche pure est généralement capable de dégrader plusieurs hydrocarbures distincts, on attend de la population mixte d'un sol une efficacité supérieure (DAVIS, 1967).

Depuis STONE (1940), on sait que les microorganismes utilisent en premier lieu les fractions paraffiniques linéaires, puis les naphténiques, les aromatiques et les asphaltiques.

On peut donc, schématiquement, classer les divers composés d'un pétrole brut par ordre d'assimilation décroissante, en notant toutefois que la quasi-totalité des hydrocarbures peut être métabolisée, à plus ou moins long terme.

2.1.3. Assimilation des n-alcanes

2.1.3.1. - Caractères généraux

Les paraffines sont les meilleurs substrats hydrocarbonés. On s'accorde à penser que les microorganismes se développent plus volontiers sur les n-alcanes contenant de 9 à 16 atomes de carbone (FOSTER, 1962; SHARPLEY, 1966; STRAWINSKI et STONE, 1940).

Le taux d'assimilation plus faible observé sur les fractions de poids moléculaire élevé, qu'elles soient paraffiniques, naphténiques, aromatiques ou asphaltiques, est dû à la surface de contact réduite entre la molécule et les microorganismes.

On pense en effet que la biodégradation est limitée à l'interface eau-huile (DAVIS, 1967).

Les alcanes à chaîne courte (n-C_5 à n-C_8) sont reconnus toxiques pour la plupart des microorganismes. Ces composés sont en effet des solvants pour les constituants cellulaires que sont les lipides. On a pourtant noté que certains microorganismes se développaient par exemple, dans un milieu contenant de l'hexane à concentration inférieure au taux de saturation (JOHNSON, 1964). Pseudomonas aeruginosa se développe sur n-heptane (SENEZ, 1956).

Les microorganismes actifs sur les n-paraffines appartiennent aux genres Pseudomonas (HAAS, 1941; HERING et coll., 1961; THIJSSE et VAN DER LINDEN, 1958), Mycobacterium (HAAS, KRASIL NIKOV, 1971), Actinomyces et Corynebacterium (HAAS, 1941). Candida dégrade les molécules à nombre de carbone inférieur à 11, tandis que des souches de Penicillium et d'Aspergillus attaquent des molécules à nombre de carbone supérieur à 11 (NYNS, 1968).

Les souches qui assimilent les alcanes courts (C_5 à C_8) assimilent souvent les alcanes longs ($> C_8$) mais la réciproque n'est pas vraie (FREDERICKS, 1966).

2.1.3.2. Voies métaboliques

STONE (1940) et HAAS (1941) ont constaté que peu de produits extracellulaires étaient excrétés lors de la biodégradation des paraffines. Le rapport CO_2/O_2 au cours de l'oxydation microbienne de

paraffines s'élève en moyenne à 0,65 (STONE, 1942). Ceci indique une oxydation complète des paraffines. Le rapport théorique CO_2/O_2 pour le radical $-CH_2-$ est en effet voisin de 0,67.

$$- CH_2 - + 1,5\ O_2 \longrightarrow CO_2 + H_2O.$$

On s'accorde à penser que la voie majeure de l'attaque enzymatique de n-paraffines se localise à l'extrémité de la chaîne pour donner un alcool, éventuellement un aldéhyde, et enfin un acide gras à même nombre d'atome de carbone (AZOULAY, 1966). Ce dernier peut alors être scindé en métabolites assimilables par α-, β-ou ω-oxydation, ou peut être recombiné avec l'alcool pour donner un ester.

L'enzyme permettant la conversion de l'alcane en alcool gras est une ω- hydroxylase qui nécessite NAD comme cofacteur(PETERSON et coll., 1966; COON et coll., 1967).

On a isolé des métabolites intermédiaires tels des acides dicarboxyliques, des diols, des méthyl cétones et des alcools secondaires qui montrent que d'autres voies métaboliques existent également. Si la respiration est bloquée, on peut noter l'apparition d'un alcène comme métabolite intermédiaire qui réintègre la voie précédente au niveau de l'alcool (WAGNER et coll., 1967; LEAVITT, 1966).

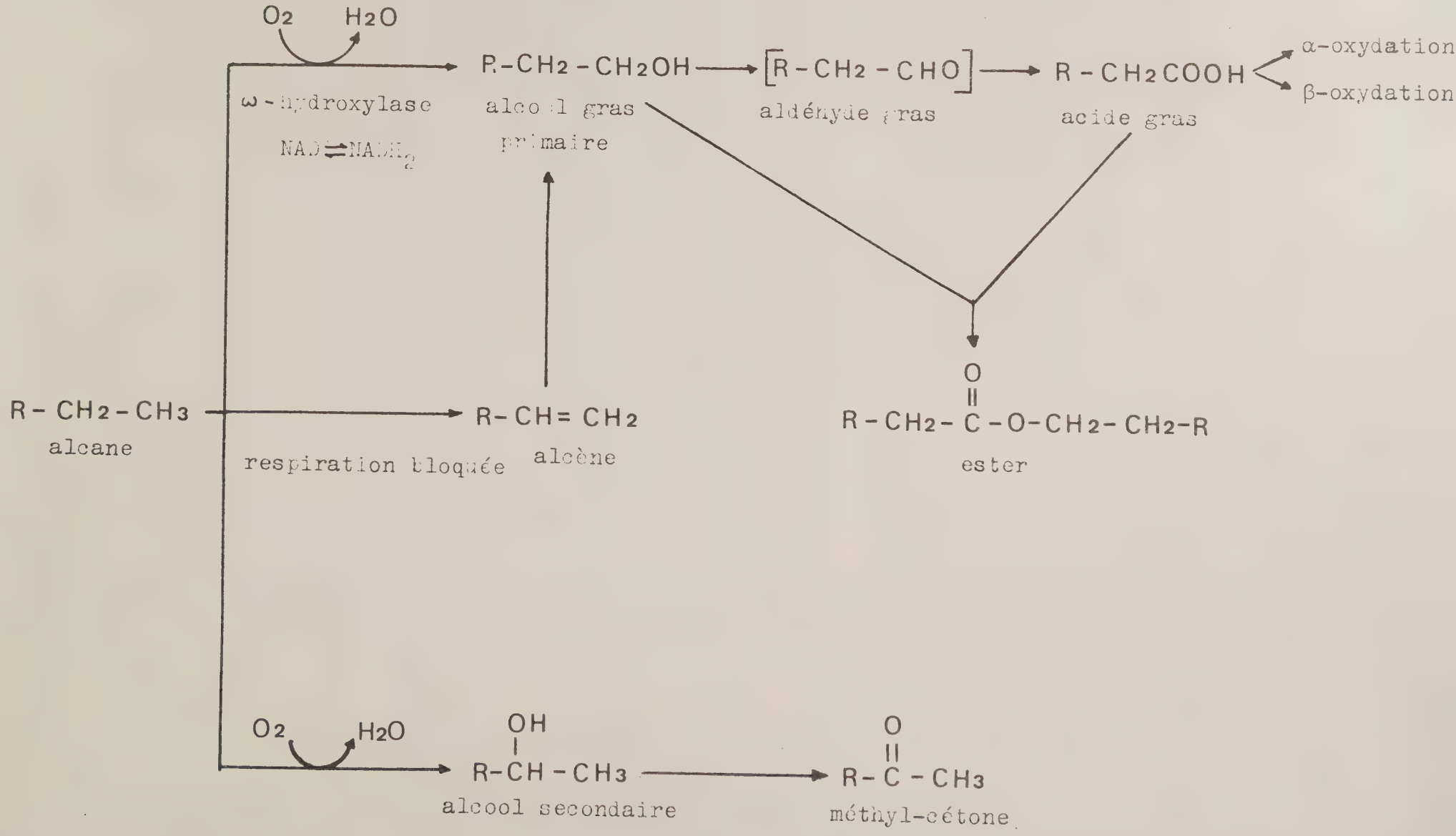
Voir figure 2.1.

Dans tous les cas, il apparaît que lorsqu'une molécule de n-alcane est attaquée, la quasi-totalité en est utilisée, c'est-à-dire qu'il y a très peu de produits extracellulaires. Ce haut degré de biodégrabilité est particulièrement notable chez les n-alcanes dont la chaîne comporte de 10 à 18 atomes de carbone (TRECCANI,1963).

L'oxydation des n-paraffines a été également étudiée par RAYMOND (1961), SIMAKOVA (1968) VANEYCK et BARTELS (1970).

Figure 2_1

Dégradation microbienne des n-alcanes



2.1.4. Assimilation des alcanes ramifiés

L'utilisation microbienne des iso-alcanes est beaucoup plus lente que celle des n-alcanes à même nombre de carbone (VAN DER LINDEN, 1965). La position, la taille et le nombre de substitués alkylés ont un effet défini sur la biodégrabilité de la paraffine (HUMPHREY, 1967). On peut constater alors une accumulation de produits extracellulaires.

Le métabolisme ne semble cependant pas fondamentalement différent de celui des n-alcanes (KALLIO, 1969).

WODZINSKI (1967) a obtenu des cultures sur pristane présentant un rendement (g. cellules/g. hydrocarbures) dépassant 100%.

2.1.5. Assimilation des alcènes

Les 1-alcènes de 10 à 18 atomes de carbone sont de moins bons substrats que les alcanes correspondants. Ils sont cependant assimilés par de nombreuses souches de levure (KLUG, 1967), et de bactéries.

Les 1-alcènes à nombre pair d'atome de carbone subissent une attaque diterminale et donnent un acide gras saturé à (2n-1) atomes de carbone.

Les 1-alcènes à nombre impair d'atome de carbone se transforment en acides ω -insaturés à même nombre de carbone (MAKULA, 1968).

2.1.6. Assimilation des cycloparaffines

On pensait encore récemment que les composés naphténiques (cycloalcanes, cycloalcènes) étaient résistants à l'action des microorganismes. Mais on a pu isoler plusieurs souches de bactéries se développant rapidement sur des alcanes cycliques (HILL, 1967). La décaline est biodégradable (Mc KENNA, 1965).

De plus, de nombreux cycloalcanes, qui ne sont pas attaqués lorsqu'ils constituent l'unique source de carbone, peuvent être oxydés si d'autres hydrocarbures sont utilisés comme substrats de croissance.

C'est le phénomène de cooxydation, défini par FOSTER (1962). Voir tableau 2.3.

2.1.7. Assimilation des aromatiques

2.1.7.1. Caractères généraux.

Les aromatiques ont une polarité élevée et ont donc une action sur la perméabilité cellulaire.

Ils seront généralement moins volontiers utilisés que les hydrocarbures saturés. Pourtant le sol contient de nombreux micro-organismes susceptibles de dégrader les aromatiques. Les molécules monocycliques sont attaquées plus volontiers que les polycycliques. STEVENSON (1967) a trouvé que sur 130 souches isolées du sol, 77% sont capables d'assimiler au moins deux hydrocarbures aromatiques. 15 % d'entre elles appartiennent au genre Arthrobacter. KUNC (1866) et MULLAKHANBAI (1966) ont également signalé des espèces d'Arthrobacter dégradant des aromatiques. Des souches de Pseudomonas (ROGOFF, 1962) ainsi que Mycobacterium rhodochrous (GIBSON et coll., 1967) présentent la même caractéristique. Un actinomycète du genre Nocardia assimile le toluène (FORRO, 1966).

Le xylène et ses dérivés sont de meilleurs substrats que le benzène ou le toluène.

2.1.7.2. Voies métaboliques.

Le noyau aromatique des hydrocarbures s'oxyde par double hydroxylation en positions vicinales, suivie par la rupture du cycle, soit entre les deux atomes de carbone porteurs des groupements hydroxyles, soit entre un de ces carbones et celui adjacent.(GIBSON, DAGLEY, 1967). Voir figure 2.2.

Ainsi, le principal produit de dégradation du benzène est le catechol, dont la conversion en acide cis-cis muconique est généralement faible.

Pour le naphtalène, le produit de dégradation en majorité obtenu est l'acide salicylique.

L'oxydation d'aromatiques méthyl- ou alkyl - substitués conduit à de nombreux produits de dégradation. Voir tableau 2.2. d'après RAISBECK (1972).

Notons que pour les aromatiques la dégradation par cooxydation permet l'attaque d'un grand nombre de composés (DOUROS,1968; ABBOTT, 1971; RAISBECK, 1972). Voir tableau 2.3.

Les déchets pétroliers contiennent généralement un mélange d'hydrocarbures. Les conditions favorables à la cooxydation sont donc réunies.

Figure 2.2

Dissimilation des hydrocarbures aromatiques

Voies métaboliques probables de la dégradation du benzène et du naphtalène.

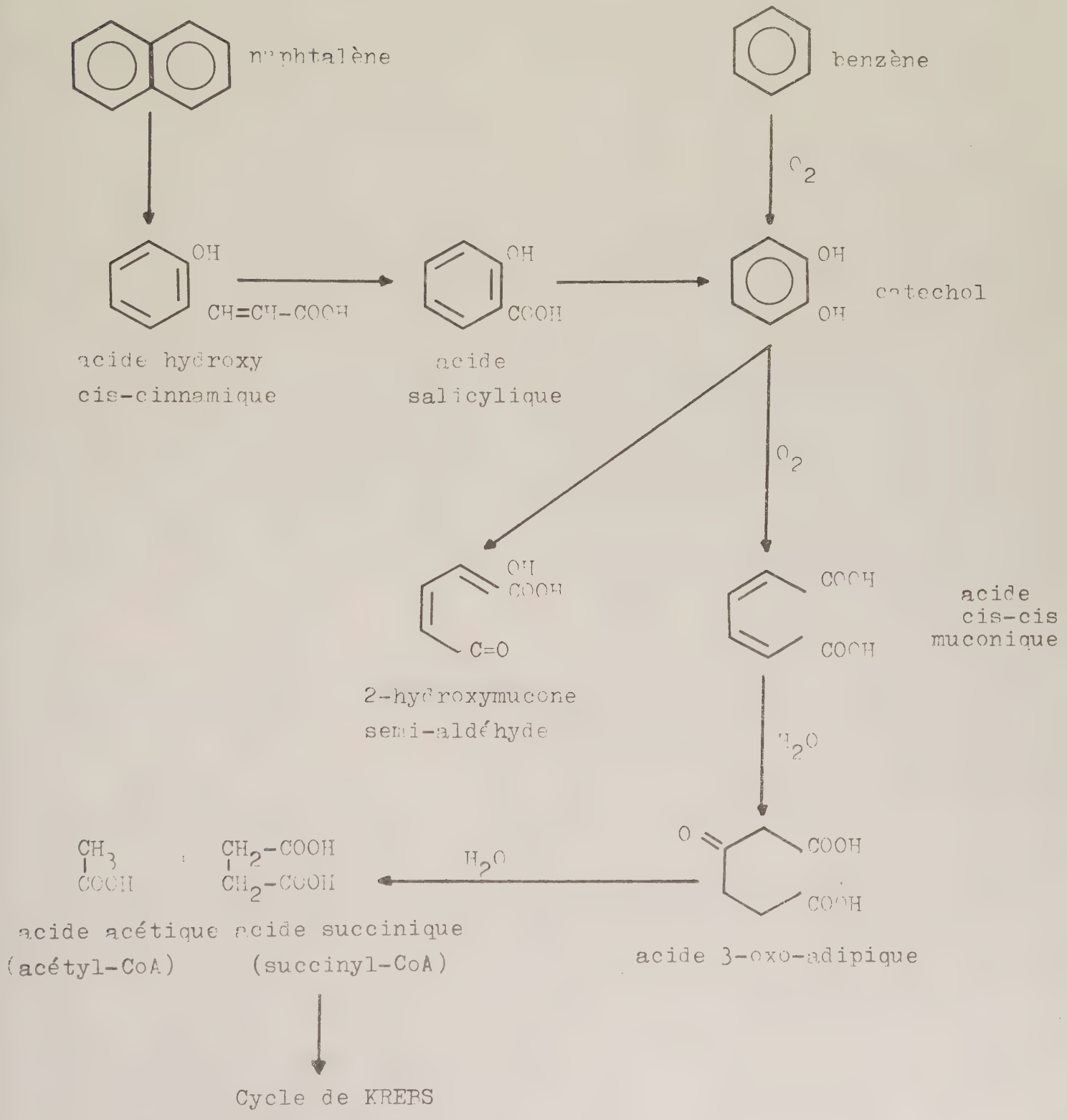


Tableau 2.2

Oxydation microbienne d'aromatiques méthyl- et alkyl-substitués.

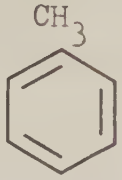
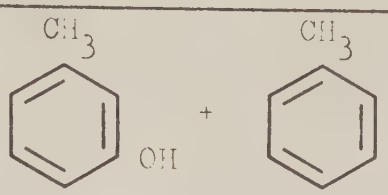
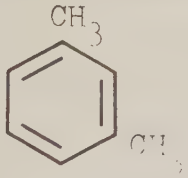
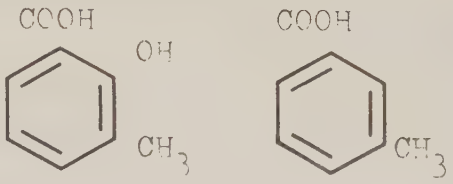
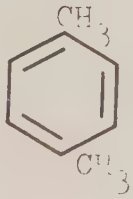
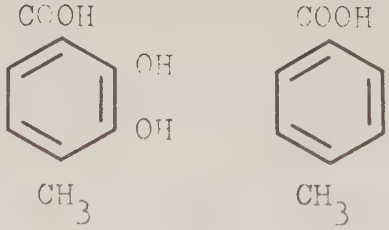
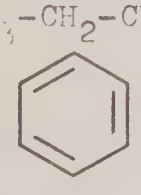
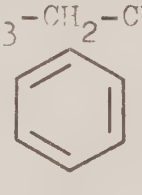
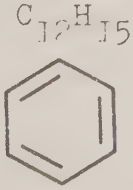
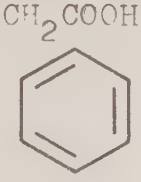
Hydrocarbure	Produits d'oxydation	Microorganisme
 toluène	 m-crésol + p-crésol	Pseudomonas sp.
 m-xylène	 ac.3-méthyl salicylique + acide p-toluique	Ps. aerugirosa
 p-xylène	 ac.2-3 dihydroxy-p-toluique + acide p-toluique	Nocardia salmonicolor
 n-isopropyl toluène	 acide p-isopropylbenzoique	Pseudomonas sp.
 n-dodecyl benzène	 acide phénylacétique	Nocardia sp.

Tableau 2.3.

Biotransformation d'hydrocarbures par cooxydation

ubstrat de croissance	substrat cooxydé	Produits	Microorganisme
Extrait de levure ou peptone	n-hexadecane	2-,3-,4-hexadecanone 2-,3- hexadecanol	Arthrobacter sp
Glucose	n-hexadecane et autres alcanes	glycolipides	Torulopsis apicola
Glucose	isoalcanes	glycolipides	Torulopsis gropenglesseri
-méthyl butane	méthyl cyclopentane	3-méthyl cyclopentanone	Pseudomonas sp.
-méthyl butane	cyclo hexane	cyclohexanone	Pseudomonas sp.
-méthyl butane	méthyl cyclohexane	4-méthyl cyclohexanone	Pseudomonas sp.
-octadecane	éthyl benzène	acide phénylacétique	Nocardia sp.
-octadecane	n-butyl benzène	acide phénylacétique	Nocardia sp.
-octadecane	n-propylbenzène	acide phénylacrylique	Nocardia sp.
-hexadecane	p-xylène	acide 2-3-hydroxy-p-toluique	N.salmonicolor N.corallina
-hexadecane	p-xylène	acide diméthyl cis,cis muconique	N. corallina
-hexadecane	1-2-4 triméthyl benzène	acide 3,4-diméthyl-benzoïque acide 2,3 hydroxy-4-,6- diméthylbenzoïque	N. corallina

2.1.8. Cas particulier des hydrocarbures gazeux

Nous ne citerons que pour mémoire l'aptitude de certaines bactéries à utiliser les hydrocarbures gazeux. Ainsi Pseudomonas radiobacter, Mycobacterium flavum methanicum assimilent le méthane et ses homologues gazeux (BOGDANOVA, 1966). Mycobacterium fl. m. assimile également le propane.

Mais dans le cas d'une épuration biologique, les hydrocarbures gazeux se seront d'eux-mêmes dilués dans l'atmosphère. Notons cependant que des problèmes peuvent se poser hors du stockage souterrain des hydrocarbures sous pression.

2.1.9. Assimilation des asphaltiques

Il s'agit de composés à poids moléculaire élevé, contenant de l'oxygène, du soufre, de l'azote ou des métaux lourds. Ce ne sont donc pas seulement des hydrocarbures.

Les composés oxygénés sont des acides gras, des phénols, des acides naphténiques, dont on a déjà décrit la dégradation. Les molécules contenant du soufre sont des mercaptans aliphatiques et cycliques (thiols). Les composés azotés, peu nombreux dans un pétrole, sont des bases, alkyl-dérivées de quinoléine ou pyridine.

Les asphaltes contiennent de nombreux cycles aromatiques, ainsi qu'une faible proportion de paraffines à nombre d'atomes de carbone élevé.

On connaît des microorganismes attaquant les molécules asphaltiques, appartenant aux genres Pseudomonas (en particulier Ps. chlororaphis), Flavobacterium, Micrococcus et Mycobacterium (HARRIS, 1966).

PHILLIPS et TRAXLER (1963) ont fait état d'une souche de Pseudomonas dégradant en un mois 90% d'un asphalte commercial en milieu minéral.

On voit donc d'après cette étude que pratiquement tous les hydrocarbures peuvent être dégradés par des microorganismes.

Nous pensons que ceci justifie le choix qui nous a conduit à étudier la dégradation microbienne en tant que facteur d'épuration d'un biotope pollué par des hydrocarbures.

2.2. TECHNIQUES BACTERIOLOGIQUES

Pour suivre le déroulement du phénomène de biodégradation, il est nécessaire de pouvoir disposer de données précises concernant la microflore.

On a été amené à employer des techniques de dénombrement de la microflore totale, et de la microflore adaptée aux hydrocarbures dans un milieu pollué, liquide ou solide.

En outre, il nous a paru intéressant de procéder à l'isolement et à l'identification des souches se développant dans un milieu contenant des hydrocarbures.

Enfin, pour nos expériences de laboratoire, nous avons sélectionné des inoculums suivant la technique des cultures d'enrichissement.

2.2.1. Dénombrement des bactéries

2.2.1.1. Dénombrement de la microflore totale.

Le principe utilisé est celui de la numération indirecte en milieu liquide (POCHON et TARDIEUX, 1962).

Pour dénombrer la microflore totale d'un sol, on procède à l'ensemencement, avec des suspensions-dilutions de ce sol, d'un milieu de culture liquide pour rechercher la dilution limite donnant lieu à un développement bactérien.

a. Milieux de cultures.

On utilise, soit un bouillon nutritif ordinaire, soit le milieu de SOUMARE et BLONDEAU (1972).

Tableau 2.4. : Bouillon nutritif.

Extrait de viande	3 g.
Peptone pancréatique	10 g
Chlorure de sodium	5 g.
Eau distillée	1000 ml

Dissoudre par chauffage, ajuster le pH à 7,2 , répartir (10 ml en tube 18 x 180). Stériliser 15 mn à 120° C.

Tableau 2.5. : Milieu de SOUMARE et BLONDEAU

Glucose	1 g.
Peptones	1 g.
Extrait de levure	1 g.
Extrait de terre	500 ml
$K H_2 PO_4$	0,5 g.
Eau distillée q.s.p.	1000 ml

Ajuster le pH à 7,0, répartir et autoclaver 20 mn à 115°C.

b. Préparation des suspensions-dilutions.

Après homogénéisation de l'échantillon, on prélève 10 g. de terre du sol à analyser.

Les 10 g. de terre sont broyés dans un mortier stérile avec 100 ml de diluant (0,1 g. de pyrophosphate de sodium -1000 ml d'eau distillée). On obtient ainsi la dilution (-1).

La dilution (-2) est réalisée en prélevant 1 ml de la suspension-dilution (-1) que l'on mélange aux 9 ml de diluant que contient le tube (-2).

L'opération est renouvelée jusqu'à obtenir la dilution (-10).

c. Ensemencement.

On ensemence trois tubes de milieu nutritif pour chaque dilution à l'aide de 1 ml de la suspension-dilution correspondante.

d. Lecture des résultats et interprétation.

On lit, après 7 jours d'incubation à 28-30°C, le nombre de tubes positifs à chaque dilution. Ceci permet de calculer le "chiffre caractéristique", et de déterminer le nombre de germes revivifiables par gramme de terre, d'après les tables de Mc CRADY.

Exemple : chiffre caractéristique, 321. 10^{-4} signifie qu'il y a

- 3 tubes + à la dilution (-4)
- 2 tubes + à la dilution (-5)
- 1 tube + à la dilution (-6)

Le nombre de germes est estimé dans ce cas à 15.10^4/g. de terre.

Pour effectuer un dénombrement de la microflore totale présente dans un milieu liquide, on emploie la même méthode. Les suspensions-dilutions se font en partant directement du milieu à analyser.

2.2.1.2. Dénombrement de la microflore adaptée aux hydrocarbures.

La méthode utilisée est la même que celle que l'on vient d'exposer. Seul change le milieu de culture. Il s'agit dans ce cas d'un milieu minéral, dérivé du milieu de KOUPENOV, ne contenant pas d'autre source de carbone qu'un hydrocarbure ou un mélange d'hydrocarbures.

Tableau 2.4. : Milieu de KOUPENOV modifié.

On prépare les solutions suivantes :

A- Solution tampon (KH_2PO_4 (0,25 M): 34 g/l.
) (Na_2HPO_4(0,25 M): 89,5 g/l.

B- $MgSO_4$, 7 H_2O : 35 g/l.

C- NO_3NH_4 : 100 g/l.

D- Solution d'oligo-éléments

$CuSO_4$: 50 mg; H_3BO_4 : 100 mg; M_nSO_4 : 100 mg;
$ZnSO_4$: 100 mg; Na_2MoO_4 : 100 mg; $CoCl_2$: 100 mg;
eau distillée : 1000 ml.

E- $CaCl_2$: 10 g/l; $FeSO_4$: 200 mg/l.

Pour un litre de milieu on utilise :

Solution A : 20 ml
Solution B : 10 ml
Solution C : 10 ml
Solution D : 0,1 ml
Solution E : 2 ml
Extrait de levure : 10 mg
Eau distillée q.s.p. 1000 ml.

Ajuster le pH à 7,0. Répartir (10 ml en tube 18 x 180). Ajouter 0,2 ml de pétrole brut (ou de gas-oil) par tube et stériliser 15 mn à 120°C.

L'ensemencement est le même que pour la microflore totale. L'incubation à 28-30°C est plus longue (14-21 jours), la microflore adaptée se développant plus lentement que la microflore banale.

La lecture des résultats et leur interprétation sont identiques à celles de la microflore totale.

2.2.2. Isolement des souches adaptées aux hydrocarbures.

La technique retenue est celle de l'isolement de souches par étalement à la surface d'un milieu gélosé. C'est donc un procédé classique (BUTTIAUX et coll.,1966).

La difficulté a été de mettre au point un milieu gélosé contenant des hydrocarbures sous une forme suffisamment divisée pour permettre la croissance des colonies.

Pour ce faire on a utilisé une technique voisine de celle décrite par BARUAH et coll. (1967).

On prépare le milieu liquide décrit pour le dénombrement des bactéries adaptées (cf.2.2.1.2.) auquel on incorpore 15 g. de gélose purifiée (purified agar Difco). Ce milieu est porté à ébullition et réparti à raison de 20 ml en tubes 20 x 200, puis stérilisé 15 mn à 120°C.

On prépare, d'autre part, un mélange de gélose purifiée et de pétrole brut, de façon à obtenir une pâte homogène. Le pétrole brut est stérilisé au préalable par autoclavage ou par ultrasons.

Au moment de couler les plaques, on réchauffe les tubes de milieu minéral gélosé. On les laisse refroidir jusqu'à la température de 50°C. On incorpore alors .1 g. du mélange gélose-purifiée-pétrole dans chaque tube. On homogénéise le tout sur un agitateur rotatif pour tube (Vortex), et l'on coule la plaque qui doit se solidifier presque immédiatement.

Le milieu obtenu contient ainsi du pétrole brut en émulsion très finement divisée qui permet le développement des colonies.

L'ensemencement se fait par les techniques classiques d'étalement de dilutions successives.

Les plaques sont mises à incuber 20 jours à 30°C.

On procède alors à la purification des souches. On prépare une suspension en eau physiologique de chaque type de colonie, dont on étale une goutte sur une plaque de gélose nutritive à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée.

Tableau 2. 7. : gélose nutritive

Peptone	10 g.
Chlorure de sodium	5 g.
Extrait de viande	3 g.
Gélose	15 g.
Eau distillée q.s.p. 1000 ml-pH: 7,0-7,2	

Les souches ainsi purifiées sont repiquées trois fois sur gélose nutritive inclinée et sont alors prêtes à l'identification.

2.2.3. Identification des souches

On utilise les techniques classiques de la microbiologie générale (BUTTIAUX, 1966; GONTCHAROFF, 1971; BERGEY'S, 1957).

Nous avons procédé à des identifications de genre, mais non d'espèces, sauf cas particulier.

2.2.3.1. Caractères morphologiques :

On a retenu les caractères suivants :

- Aspect des colonies - pigmentation
- Coloration de gram sur culture de 48 heures
- Coloration de gram sur culture de 8 jours
- Examen à l'état frais (mobilité)

2.2.3.2. Caractères biochimiques

- Test à l'oxydase

On nébulise les colonies avec une solution aqueuse de diméthyl-paraphénylène-diamine à 1%. Si la réaction est positive, les colonies prennent une teinte rouge-brique.

On décante le réactif et on nébulise avec une solution d' α -naphtol à 1% dans de l'alcool à 95°. Si les colonies virent au bleu outremer, on note cytochrome-oxydase +.

- Pigments diffusibles (Milieux de King).

  On note l'apparition de pigment bleu (King A) ou vert (King B).

- Oxydation-fermentation du glucose.

Ces caractères fondamentaux sont mis en évidence sur le milieu de BOARD et HOLDING.

Tableau 2.6. : Milieu de BOARD-HOLDING

Phosphate mono-ammonique	500 mg.
Phosphate bipotassique	500 mg.
Extrait de levure	500 mg.
Gélose	20 g.
Glucose	5 g.
Eau distillée	1.000 ml
Rouge de phénol. coloration a minima pH : 7,2	

- Caractères complémentaires.

Dans certains cas, on a été amené à rechercher des caractères complémentaires particuliers.

. coloration de cils (méthode de RHODES)
. bouillon nitrate
. Production d'H_2S
. Production de gaz
. Type respiratoire
. Sporulation (méthode de TRUJILLO)

2.2.4. Obtention de souches actives vis-à-vis des hydrocarbures (inoculum).

Pour les expériences in vitro de biodégradation de produits pétroliers en milieu liquide, il était nécessaire d'obtenir des inoculums composés de souches adaptées à l'assimilation des hydrocarbures.

Pour ce faire, on a employé la méthode d'enrichissement par cultures successives.

La probabilité de sélectionner des souches adaptées est plus forte si l'on prend pour matériel de base un sol pollué par des hydrocarbures.

On a obtenu plusieurs inoculums distincts en partant de sols pollués d'origines différentes.

Dans tous les cas, la technique est la suivante : On réalise une première culture en milieu de KOUPENOV modifié, auquel on a incorporé du pétrole brut (ou toute fraction pétrolière adéquate.

L'ensemencement est réalisé avec 1% de terre provenant du sol pollué considéré.

Après une agitation vigoureuse, on fait incuber cette culture pendant 15 jours à 3 semaines. La température d'incubation est fonction du but recherché.

Pour nos essais de laboratoire, nous avons en général choisi la température de 30°C, permettant une cinétique de biodégradation favorable à l'observation.

On effectue alors un repiquage de cette préculture dans une fiole Erlenmeyer de 250 ml contenant 100 ml de milieu de KOUPENOV modifié contenant 1% de pétrole brut.

On réalise ensuite une série de cultures successives ayant pour origine la culture précédente.

Après 3 à 4 repiquages, on considère que la microflore adaptée à la consommation des hydrocarbures est devenue dominante.

On a ainsi obtenu un inoculum contenant une population mixte bactérienne, que l'on pourra conserver au laboratoire par des repiquages successifs.

On utilise l'inoculum à des fins expérimentales lorsqu'il est âgé de 5 à 10 jours. Nous supposons que les bactéries sont alors en phase de croissance exponentielle, permettant un démarrage rapide de la culture expérimentale.

2.3. ANALYSE DE BACTERIES UTILISANT LES HYDROCARBURES

Il s'agit des souches bactériennes se développant sur divers substrats hydrocarbonés, qui furent isolées et identifiées en laboratoire.

2.3.1. Origine des souches

Nous avons étudié la microflore adaptée aux hydrocarbures présente dans des échantillons d'origines diverses :

- analyse de la microflore adaptée d'un sol pollué par des résidus d'hydrocarbures (la Courneuve).

- analyse de bactéries dégradant le kérosène (Strasbourg).
- analyse de souches constituant les inoculums utilisés au laboratoire (Orange, la Chênaie).

2.3.1.1. la Courneuve

Cette étude a eu pour cadre le Dépôt des Essences des Armées de la Courneuve.

On a procédé en novembre 1973 à l'épandage sur le sol de résidus lourds de carburants contenus dans une cuve creusée dans le sol(voir 5.1)

Ces résidus pétroliers ont été traités à l'aide du produit S 320 (voir 4.1) et épandus sur des terrains expérimentaux à diverses concentrations.

2.3.1.2. Strasbourg

Des infiltrations de kérosène dans le sol s'étaient produites à la suite de fuites de stockages, dans la région de Strasbourg.

On a procédé à des carottages permettant de déterminer la profondeur d'infiltration du kérosène.

Au cours de ces forages on a prélevé des hydrocarbures ayant séjourné dans le sol au-dessus.du niveau hydrologique. Un développement microbien a été observé à l'interface eau-kérosène, et a fait l'objet d'une analyse visant à déterminer la composition de cette microflore.

2.3.1.3. Les inoculums : terre d'Orange et terre de la Chênaie.

On a également procédé à l'isolement et à l'identification des souches constituant les inoculums utilisés au laboratoire, ceux-ci ayant été obtenus par le procédé décrit au chapitre 2.2.4.

L'"inoculum d'Orange" provient d'un sol pollué par du fuel domestique répandu accidentellement, à la suite de la rupture d'un pipe-line, dans la région d'Orange.

L'"inoculum de la Chênaie" a une origine différente. On sait que les composés hydrocarbonés à poids moléculaire élevés, naphténiques ou aromatiques sont moins volontiers attaqués que les paraffines (cf.2.1.).

Nous avons donc cherché à obtenir un inoculum contenant des souches adaptées à la dégradation de ces fractions. Nous avons volontairement pollué avec un pétrole brut un sol de forêt, les nombreux produits de l'humus forestier nous laissant supposer que nous pouvions espérer une microflore assez riche, et contenant des espèces aptes à la dégradation de composés complexes.

Nous avons choisi un humus forestier de chênaie (Forêt de la Chênaie, Ille-et-Vilaine).

On a prélevé la terre polluée de cette chênaie, trois semaines après l'épandage d'hydrocarbures, et on a procédé aux cultures successives d'enrichissement permettant d'obtenir un inoculum.

2.3.2. Analyses de la microflore adaptée de la Courneuve.

On a employé les techniques exposées aux paragraphes 2.2.2. et 2.2.3. (BERGEY'S, 1957; BUTTIAUX, 1966).

2.3.2.1. Résultats

Voir tableau 2.9.

2.3.2.2. Interprétation

On note la prédominance très nette du genre Arthrobacter (Corynebacterie) et la présence de Micrococcus. Les souches de Pseudomonas sont peu nombreuses.

2.3.3. Analyse de la microflore du kérosène.

On prélève la biomasse développée à l'interface eau-kérosène. Celle-ci est homogénéisée dans du diluant (pyrophosphate de sodium à 1 ‰ dans de l'eau distillée).

On réalise les dilutions successives qui permettent l'isolement sur plaques de gélose contenant une émulsion de pétrole brut (cf.2.2.2.).

2.3.3.1. Résultats

Voir tableau 2. 10.

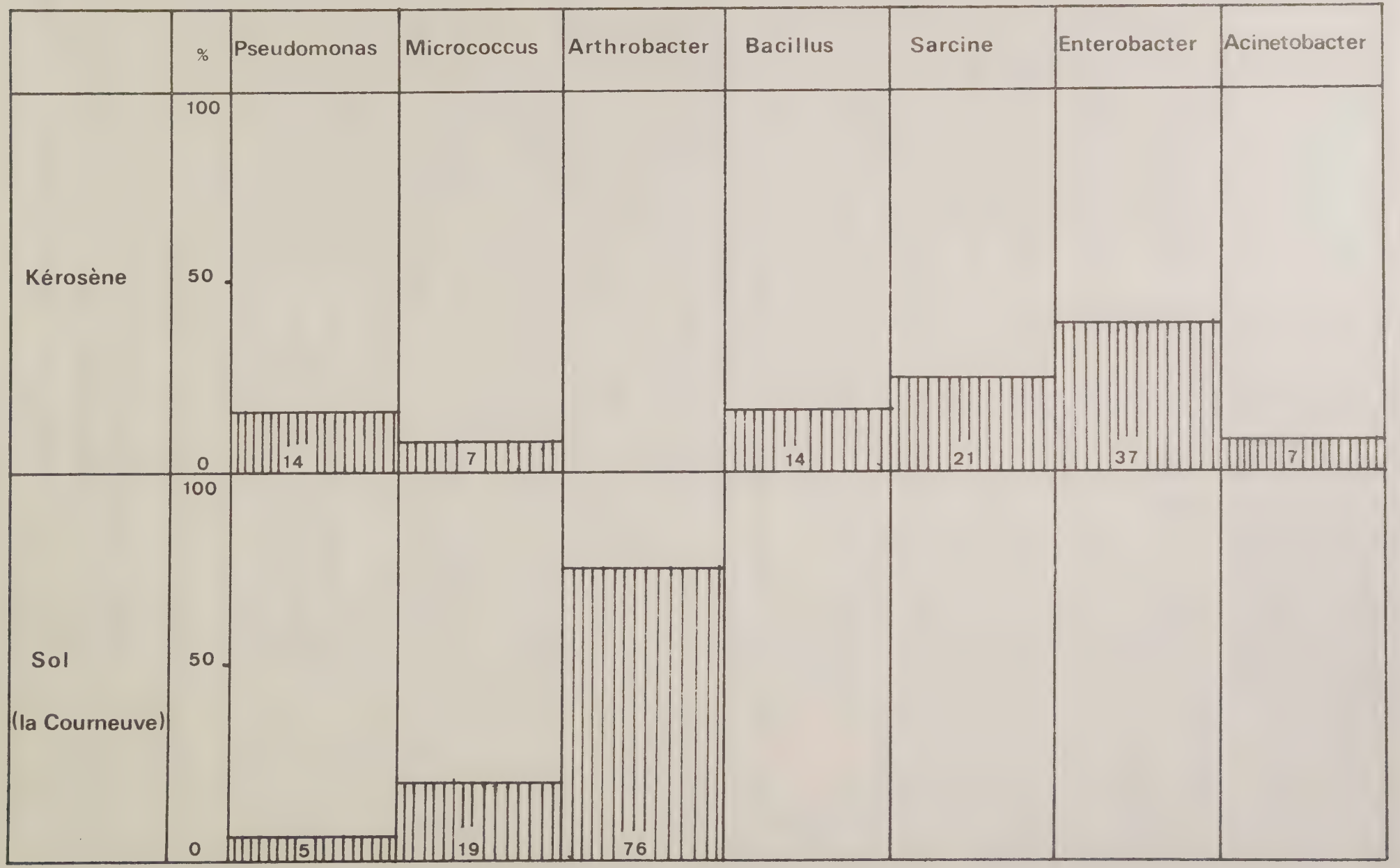
Tableau 2.9. Microflore adaptée de la Courneuve.

uche	Gram 24 H	Gram 8 jours	Oxydase	Oxydation Glucose	Fermentation Glucose	Mobilité	Identificatio
I	Bac. G+	Bac. ± + Coques	-	+	-	--	Arthrobacter
2	Bac. G+	Bac. ± + Coques	-	+	-	-	Arthrobacter
3	Bac. G+	Bac. ± + Coques	-	+	-	-	Arthrobacter
4	id.	id.	id.	id.	id.	id.	id.
5	id.	id.	id.	id.	id.	id.	id.
6	id.	id.	id.	id.	id.	id.	id.
7	id.	id.	id.	id.	id.	id.	id.
8	id.	id.	id.	id.	id.	id.	id.
9	id.	id.	id.	id.	id.	id.	id.
10	id.	id.	id.	id.	id.	id.	id.
11	id.	id.	id.	id.	id.	id.	id.
12	Coques G^+		-	+	-	-	Micrococcus
13	Coques G-		-	-	-	-	Micrococcus
14	Coques G-		-	-	-	-	Micrococcus
15	Bac. G+	Bac G+ + coques	-	+	-	-	Arthrobacter
16	Bac. G+	Bac. G+ + coques	-	+	-	-	Arthrobacter
17	Bac. G-		+	+	-	+	Pseudomonas
18	Bac. G+	Bac. G+ + Coques	-	+	-	-	Arthrobacter
19	Bac. G+	Bac G.± + Coques	-	+	-	-	Arthrobacter
20	Bac. G+	Bac G.± + Coques	-	+	-	-	Arthrobacter
21	Coques G-		-	+	-	-	Micrococcus

Tableau 2.10 Microflore adaptée du kérosène

uche	Gram	Oxydase	Oxydation Glucose	Fermentation Glucose	Mobilité	Autres caractères	Identificatio
1	Bac.Gr-	+	+	-	+	Pigment vert diffusible	Pseudomonas fluorescens
2	coque Gr+ amas cubique	-	-	-	-	colonie jaune	Sarcine
3	Bac.Gr+ spores	-	+	-	+	envahit la gélose	Bacillus
4	Bac.Gr+ spores	-	+	-	+	envahit la gélose	Bacillus
5	coques Gr+ amas cubique	+	-	-	-	colonie jaune	Sarcine
6	Coques Gr+ amas cubique	+	-	-	-	colonie jaune	Sarcine
7	Cocco bacille Gr -	-	+	+	+	Production de gaz	Enterobacter
8	Cocco bacille Gr -	-	+	+	+	Production de gaz	Enterobacter
9	Bac. Gr -	-	+	+	+	Production de gaz	Enterobacter
0	coques Gr +	-	+	-	+		Micrococcus
1	Bac. Gr-	+	-	-	-		Acine tobacter
2	Bac. Gr -	-	+	+	+	Production de gaz	Enterobacter
3	Bac. Gr -	+	+	-	+		Pseudomonas
4	Cocco bacille Gr -	-	+	+	+	Production de gaz	Enterobacter

Figure 2.3: Composition de microflores adaptées à la dégradation des hydrocarbures: comparaison kérosène-sol pollué.



2.3.3.2. Interprétation

Il s'agit d'une microflore complexe contenant principalement des bactéries Gram -: Enterobacter (Aerobacter), Pseudomonas et des coques (Sarcine, Micrococcus), ainsi que quelques souches de Bacillus.

2.3.4. Comparaison de ces deux microflores.

En se reportant à la figure 2.3, on remarque que les compositions des deux microflores diffèrent sensiblement. En effet, si l'on trouve dans les deux cas des souches de Pseudomonas et de Micrococcus, les espèces prédominantes sont du genre Arthrobacter pour le sol (la Courneuve) et du genre Enterobacter pour le kérosène.

N.B. : Les pourcentages donnés fournissent des indications, et non des valeurs statistiques précises, le nombre de souches isolées étant trop restreint.

2.3.5. Analyse des inoculums d'Orange et de la Chênaie.

Dans cette étude, on a cherché à déterminer la composition moyenne des inoculums, utilisés lors des tests de biodégradation du pétrole brut, ainsi que leur évolution au cours d'une culture de deux mois en milieu fermé. On a voulu déterminer si la composition de l'inoculum restait stable, ou s'il existait une succession d'espèces au cours de la biodégradation d'un pétrole brut.

2.3.5.1. Protocole expérimental.

On a réalisé deux cultures en fioles Erlenmeyer de 500 ml contenant chacune 200 ml de milieu de KOUPENOV modifié, la source de carbone et d'énergie étant apportée par du pétrole brut de KUWEIT(PB).

- Fiole 1 : 200 ml MM+2 ml PB + inoculum provenant de terre d'Orange.

  Fiole 2 : 200 ml MM + 2 ml PB + inoculum provenant de terre de la Chênaie.

Les fioles ont été mises à incuber à 30°C en étuve fixe pendant 2 mois.

On a procédé aux analyses de ces cultures au bout de 5,21 et 60 jours.

Les techniques d'isolement et d'identification sont celles précédemment exposées (2.2.2., 2.2.3.).

Tableau 2.II

Analyse de l'inoculum d'Orange

T	Souche	Gram	Oxydase	Oxydation glucose	Fermentation glucose	Autres caractères	Mobilité	Identification
5 jours	I_1	Bac. G -	+	+	-	pigments verts diffusibles	+	Pseudomonas fluorescens
	I_2	"	+	+	-	"	+	"
	I_3	"	+	+	-	"	+	"
	I_4	"	+	+	-	"	+	"
	I_5	Bac. G - chaînettes	-	-	-		-	Acinetobacter
	I_6	Bac. G -	+	+	-	pigment diffusible	+	Pseudomonas fluorescens
	I_7	"	+	+	-	"	+	"
	I_8	Bac. G + spores	-	+	-		+	Bacillus
	I_9	Bac. G +	-	+	-		+	"
	I_{10}	Bac. G -	+	+	-	pigment diffusible	+	Pseudomonas fluorescens
21 Jours	I_{11}	Bac. G -	+	+	-	pas de pigments cils polaires	+	Pseudomonas
	I_{12}	"	+	+	-	"	+	"
	I_{13}	"	+	+	-	"	+	"
	I_{14}	"	+	+	-	"	+	"
	I_{15}	"	+	+	-	"	+	"
	I_{16}	"	+	+	-	"	+	"
	I_{17}	"	+	+	-	"	+	"
	I_{18}	"	+	+	-	"	+	"
	I_{19}	"	+	+	-	"	+	"
	I_{20}	"	+	+	-	"	+	"
	I_{21}	"	+	+	-	"	+	"
	I_{22}	"	+	+	-	"	+	"
	I_{23}	"	+	+	-	"	+	"
	I_{24}	"	+	+	-	pigment vert diffusible	+	Pseudomonas fluorescens
	I_{25}	"	+	+	-	"	+	"
	I_{26}	"	+	+	-	"	+	"
	I_{27}	"	+	+	-	"	+	"
	I_{28}	"	+	+	-	"	+	"
	I_{29}	"	+	+	-	"	+	"
60 jours	I_{30}	Bac. G -	+	+	-	pas de pigments	+	Pseudomonas
	I_{31}	"	+	+	-		+	"
	I_{32}	Bac. G + sporulé	-	+	-	colonie rose	+	Bacillus
	I_{33}	Coque G +	-	-	-		-	Micrococcus
	I_{34}	Coque G +	-	+	+		-	"
	I_{35}	Coque G +	-	+	+	colonie jaune	-	"
	I_{36}	Bac. G -	-	-	-		-	Acinetobacter
	I_{37}	Bac. G -	+	+	-		+	Pseudomonas
	I_{38}	Coque G +	-	-	+	colonie jaune	-	Micrococcus
	I_{39}	Coque G +	-	+	-	colonie jaune	-	"
	I_{40}	Coque G +	-	-	-	colonie jaune	-	"

Tableau 2.I2

Analyse de l'inoculum de la Chênaie

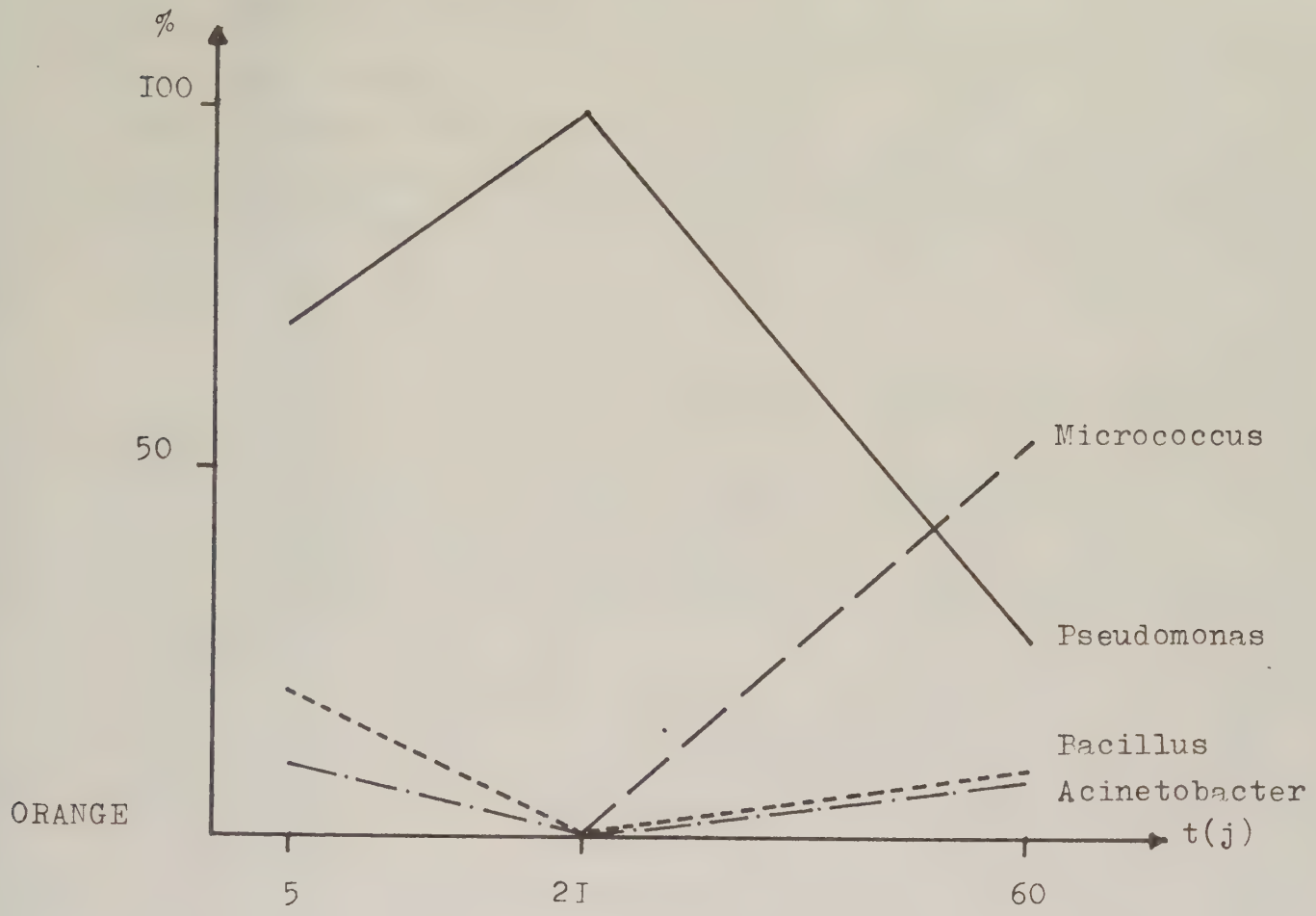
T	Souche	Gram	Oxydase	Oxydation glucose	Fermentation glucose	Mobilité	Autres caractères	Identification
5 jours	II_1	Bac. G-	-	+	-	-		Acinetobacter
	II_3	"	-	-	-	-		"
	II_4							Levure
	II_5	Bac. +coque					Gram variable	Arthrobacter
	II_6	" "					"	"
	II_7	Bac. G -	+	-	-	+		Pseudomonas
	II_8	"	-	-	-	-		Acinetobacter
	II_9	"	+	-	-	-		"
	II_{11}	"	+	+	+	-		Aeromonas
	II_{12}	"	+	+	+	-		"
	II_{13}	Bac. G +					colonie rose	Bacillus
	II_{14}	"					"	"
	II_{16}	Bac. G +						"
	II_{17}	Bac. G -	-	+	-	-		Acinetobacter
	II_{18}	"	-	-	-	-		"
	II_{19}	"	+	+	-	-		"
	II_{20}	Bac.+coque					Gram variable	Arthrobacter
	II_{21}	"					"	"
	II_{22}	Bac.G -	+	+	+	-		Aeromonas
	II_{25}	"	+	+	+	-		"
	II_{26}	"	+	+	+	-		"
	II_{27}	Bac.+coque						Arthrobacter
	II_{28}	Bac.G -	+	+	+	-		Aeromonas
21 jours	II_{30}	Bac.G -	+	+	-	-		Acinetobacter
	II_{31}	Bac. G +, spores	-	-	-	+		Bacillus
	II_{32}	Coque G-	-	-	-	-		Micrococcus
	II_{33}	Bac.G +, spores	-	+	-	+		Bacillus
	II_{34}	Bac.G -	+	+	-	+		Pseudomonas
	II_{35}	Bac.G -	+	+	-	+		"
	II_{36}	Bac.G +, spores	-	-	-	+		Bacillus
	II_{37}	Bac.G -	+	+	-	+		Pseudomonas
	II_{38}	"	+	+	-	+		"
	II_{39}	"	+	+	-	+		"
	II_{40}	Bac.G +, spores	-	+	-	+		Bacillus
	II_{41}	Bac.G. +	-	-	-	+		"
	II_{42}	Coque G -	-	-	-			Micrococcus
	II_{43}	Bac.G +, spores	-	+	-	+		Bacillus
	II_{44}	Coque G -	-	-	-	+		Micrococcus
	II_{46}	Bac.G +	-	-	-	+		Bacillus
	II_{47}	"	-	+	-	+		"
	II_{48}	Coque G -	-	-	-	+		Micrococcus
	II_{49}	Bac.G -	+	+	-	-		Acinetobacter
60 jours	II_{50}	Bac G +	-	+	-	-		Arthrobacter
	II_{51}	Bac. G -	-	+	-	-		Acinetobacter
	II_{52}	Bac. G +	-	+	-	-		Arthrobacter
	II_{53}	Coque G -	-	+	-	-		Micrococcus
	II_{54}	Bac. G -	+	+	-	-		Acinetobacter
	II_{55}	Bac.G -	-	-	-	-		"
	II_{56}	Coque G +	-	+	-	-		Micrococcus
	II_{57}	"	-	+	-	-		"
	II_{58}	Bac. G -	-	+	-	-		Acinetobacter
	II_{59}	Bac. G -	+	+	-	-		"
	II_{60}	Bac. G -	+	+	-	+		Pseudomonas
	II_{61}	"	+	-	-	+		"
	II_{62}	"	+	+	-	+		"

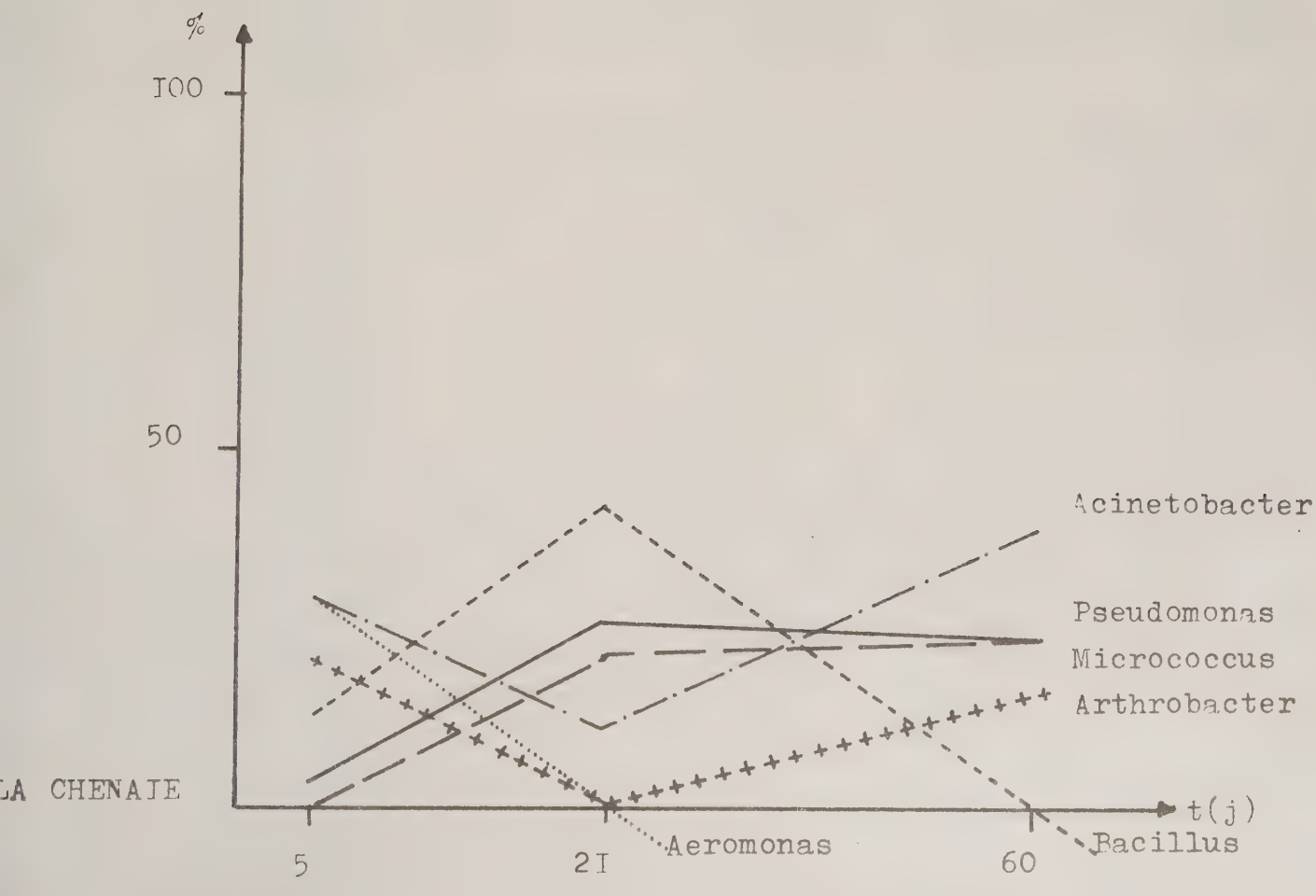
TABLEAU 2. 13

Pourcentage des différents genres constituant les inoculums d'Orange et de la Chênaie

	T jours	Pseudomonas	Acinetobacter	Pacillus	Micrococcus	Arthrobacter	Aeromonas	Levure
ORANGE	5	70	10	20	0	0	0	0
	21	100	0	0	0	0	0	0
	60	27	9	9	55	0	0	0
LA CHENAIE	5	4	29	13	0	21	29	4
	21	26	11	42	21	0	0	0
	60	23	38	0	23	16	0	0

Figure 2.4: Représentation graphique.
de l'évolution comparée des inoculums d'Orange et de la Chênaie





2.3.5.2. Résultats.

Les tableaux 2.11 et 2.12, donnent le détail du protocole d'identification des souches.

Le tableau 2.13 et la figure 2.4 donnent les pourcentages des différents genres et la représentation graphique de l'évolution des inoculums.

2.3.5.3. Interprétation.

Les souches isolées (Pseudomonas, Micrococcus, Bacillus, Acinetobacter) appartiennent à des genres que l'on retrouve dans les deux inoculums mis à part Arthrobacter et Aeromonas que l'on n'a isolé que dans l'inoculum d'Orange.

On constate dans les deux cas une nette variation dans la composition des inoculums.

On peut considérer globalement que les souches les plus nombreuses appartiennent au genre Pseudomonas dans un premier temps, relayées ensuite par des Micrococcus (Orange) et des Acinetobacter (la Chênaie).

Il y a donc une succession d'espèces au cours de la biodégradation d'un pétrole brut. Ceci s'explique par le fait que les souches ont une action sélective vis-à-vis de fractions hydrocarbonées déterminées.

Au cours de la dégradation, la composition du substrat pétrolier varie, d'où la succession biologique des espèces. Les souches actives en début de dégradation sur les fractions légères (en particulier paraffiniques), sont relayées par des souches, auparavant inhibées, actives sur les fractions moins aisément dégradables : naphténiques, aromatiques et asphaltiques.

2.3.6. Discussion des résultats.

Les stockages d'hydrocarbures sont souvent contaminés par des microorganismes, ce qui peut poser des problèmes technologiques. On a donc été amené à chercher des méthodes d'isolement et d'identification de ces microorganismes (MESHKOV, 1958; HILL et coll., 1967; HAZZARD, 1967; EDMONDS et COONEY, 1967).

CHURCHILL (1963) relève que la microflore prédominante dans les stockages de carburant d'aviation est constituée de souches bactériennes appartenant aux genres : Pseudomonas aeruginosa, Enterobacter, Clostridium, Desulfovibrio desulfuricans, Bacillus sp. Micrococcus sp., et de souches de champignons appartenant aux genres : Penicillium luteum, Aspergillus flavus, Fusarium sp., Cladosporium sp.

HEDRICK et coll. (1963) ontcultivé19 microorganismes sur milieu minéral avec fuel. Il ressort de cette étude que les microorganismes viables après 4 mois, en culture pure ou mixte, sont des souches de : Pseudomonas aeruginosa, Ps. fluorescens, B. subtilis, Enterobacter, Cladosporium resinae.

Par contre, les champignons (Aspergillus niger, Fusarium roseum, Penicillium ochrochloron) disparaissent au bout de trois semaines.

HEDRICK et coll. confirment en 1968 ces résultats.

Une expérience du même type est réalisée en 1970 par COONEY et KULA. Ces auteurs ont montré que sur 33 souches de bactéries et 6 espèces de champignon, trois souches de Pseudomonas aeruginosa et deux souches de Cladosporium sp., ont survécu à long terme. Staphylococcus aureus, Sarcina flava, Arthrobacter sp., Bacillus sp., ont montré une légère croissance, suivie d'une décroissance rapide. Les autres souches (Bacillus sp., Flavobacterium sp.) disparaissent très rapidement.

Nos résultats sont en accord avec ceux que nous venons de citer : les souches que nous avons isolées appartiennent (sauf Acinetobacter) à des genres signalés par ces auteurs.

Les souches de Pseudomonas (en particulier Ps. aeruginosa) semblent être les plus actives vis-à-vis des hydrocarbures, vraisemblablement relayées par des souches, d'Enterobacter, de Micrococcus, et dans une moindre mesure de Bacillus et d'Arthrobacter.

La succession des espèces de bactéries, dans le processus de biodégradation des hydrocarbures, semble donc bien établi.

3. TECHNIQUES D'ETUDE ET D'ANALYSE

Les expériences menées au laboratoire ont eu pour but de déterminer le rôle des paramètres influant sur la biodégradation des hydrocarbures, ou sur le développement des bactéries.

Dans chaque série d'expériences on a comparé les résultats obtenus entre des cultures faisant intervenir le paramètre étudié et des cultures témoin de référence.

L'obtention des résultats de biodégradation des hydrocarbures a nécessité la mise au point d'une technique précise de dosage quantitatif des hydrocarbures consommés.

Chaque expérience a donc été répétée un nombre de fois suffisant pour pouvoir appliquer une méthode d'analyse statistique des résultats (analyse de variance).

3. 1. CONDITIONS EXPERIMENTALES

3.1.1. Le matériel

Le substrat employé est le pétrole brut de Kuweit. Nous avons choisi une quantité d'hydrocarbures suffisante pour permettre un dosage significatif des produits pétroliers consommés.

Pour des raisons de commodité de manipulation, la valeur retenue est 1 ml. Il est en effet plus facile de travailler sur un volume, l'évaporation rapide de fractions volatiles rendant la pesée délicate et aléatoire.

La quantité de milieu a été fixée à 100 ml, de façon à ce que la concentration à l'origine hydrocarbure-milieu soit de 1% en volume, valeur citée dans la littérature comme étant favorable au phénomène étudié (DAVIS, 1967).

Nous avons donc travaillé en fioles Erlenmeyer de 250 ml, contenant 100 ml de milieu de 1 ml de pétrole brut.

La surface de contact milieu-hydrocarbure, atmosphère est alors favorable, en particulier pour les échanges gazeux.

On répartit le, ou les milieux dans les fioles qui sont bouchées au coton cardé et stérilisées 20 mn à 120°C.

Lorsque les fioles sont à la température du laboratoire, on ajoute le pétrole brut à l'aide d'une seringue de précision (Hamilton, 2500 µl), ainsi que les produits additifs si nécessaire.

Les fioles sont ensemencées avec 2 ml d'inoculum (cf.2.2.4) et mises à incuber.

Pour chaque expérience, on prépare également des fioles témoin stériles pour quantifier l'évaporation du pétrole brut, seul ou avec additif, au cours de l'incubation.

3.1.2. Les milieux de culture.

Le milieu de base utilisé est le milieu de KOUPENOV modifié (cf. : T. 2.4,p.17), dont on peut modifier la composition en fonction du but recherché.

En particulier, on a monté une série d'expériences en enlevant à chaque fois l'un des éléments du milieu, de façon à déterminer leur influence respective.

Lorsque l'on a vérifié l'action des produits F 72 et S 320, on a parfois enlevé la solution de nitrate d'ammonium, ces produits apportant de l'azote assimilable.

Pour les témoins d'évaporation, on utilise soit le milieu de KOUPENOV modifié auquel on ajoute de l'azide de sodium N_aN_3 $10^{-2}M$ qui inhibe le développement bactérien, soit simplement de l'eau distillée stérile, avec NaN_3.

3.1.3. Les conditions d'incubation.

Sauf exception, l'incubation a lieu en étuve fixe. Des essais d'incubation avec agitation ou aération ont été réalisés, mais n'ont pas donné des résultats favorables pour la lecture des essais de laboratoire (cf.: 4.3.1). La température et la durée d'incubation sont fonction du but recherché.

Sauf lorsque nous avons cherché à déterminer l'influence de la température, celle-ci a été fixée à 30°C, valeur favorable à une dégradation appréciable du substrat pétrolier en 21 jours (cf. 4.3.4.).

Nous avons fixé la durée d'incubation à 21 jours. Nos observations ne portent donc que sur cette phase du processus de biodégradation.

Nous justifions ce choix par le fait qu'on observe, au-delà de 21 jours, un ralentissement du phénomène, que nous croyons dû en partie aux conditions expérimentales.

Nous pensons en effet que la biodégradation en milieu fermé(*) a pour principe facteur limitant certains produits du métabolisme bactérien dont l'accumulation dans le milieu inhibe l'activité biodégradante. Nous avons apporté quelques éléments à ce sujet en remettant à incuber des résidus de biodégradation dans un milieu neuf (cf. 4.4.1).

3.1.4. Le pétrole brut testé.

On a utilisé, comme substrat de biodégradation, du pétrole brut de Kuweit dont la composition est donnée dans le tableau 3.1.

Tableau 3.1. : Constitution d'un pétrole brut de Kuweit (en poids).

Distillation : + 200°C vapeur	
+ 280°C charge	
Résidu : 62,12 %	
Distillat 37,88 %	
Asphaltènes	3,62%
Saturés	37,34%
Aromatiques	40,66%
Résines	18,37%

(Détermination effectuée par le service de géochimie à l'I.F.P.)

(*) non renouvelé

3.2. TECHNIQUES DE DOSAGE DES HYDROCARBURES CONSOMMES

Pour recueillir les hydrocarbures résiduaires non métabolisés, on a essayé plusieurs méthodes d'extraction par solvants, ainsi que diverses techniques de dosage (FUSEY, OUDOT, 1973).

3.2.1. Extraction des hydrocarbures résiduaires.

En fin d'expérience, on bloque les cultures par de l'acide sulfurique concentré (0,3 ml par fiole).

L'extraction est réalisée, en ampoule à décanter, par trois décantations successives à l'aide d'un volume total de solvant d'environ 50 ml.(*)

On a intéret à réaliser une décantation préliminaire,sans solvant, pour séparer la phase aqueuse des résidus pétroliers.Ces deux fractions sont traitées séparément. Les deux phases solvant obtenues sont rassemblées pour le dosage.

On a comparé les extractions réalisées avec de l'éther rectifié et du chloroforme pur. L'éther ne permet pas une extraction complète des hydrocarbures. Au cours de la décantation, la biomasse se dépose à l'interface phase aqueuse-phase solvant. Cette biomasse contient des hydrocarbures absorbés qui ne sont pas extractibles à l'éther, même en présence de soude ou d'acide sulfurique, ni par filtration Seitz.

Ce solvant a donc été abandonné au profit du chloroforme qui permet une extraction plus complète,en particulier au niveau de la biomasse.

3.2.2. Méthode de dosage.

3.2.2.1. Méthode spectrophotométrique.

On ajuste le volume de solvant recueilli à 50 ml. Une fraction en est prélevée et diluée 10 fois. La mesure est effectuée à 750 mμ, le résultat est obtenu par comparaison avec des solutions étalon pétrole brut-solvant.

Equivalence entre la densité optique et le poids d'hydrocarbures :

a- avec l'éther.

1 ml de pétrole brut PB pèse 0,851g

L'étalonnage du spectrophotomètre donne la relation :

$$C \quad PB \text{ en ml/ml d'éther} = 0{,}0093 \times do_{750m\mu}$$

D'où $$C \quad PB \text{ en g/ml d'éther} = 0{,}851 \times 0{,}0093 \times do_{750m\mu}$$

L'extraction étant réalisée avec 50 ml d'éther, puis diluée 10 fois, on a :

PB en g = 50x10x0,851x0,0093xd.o/750 mμ

PB g = 3,957 x d.o/750 mμ

b- avec le chloroforme.

Un raisonnement analogue donne la relation.

PB g = 7,106 x d.o/750 mμ

Cette méthode n'a pas pu être retenue. En effet les résidus de biodégradation ont une densité optique différente de celle du pétrole étalon. On obtenait ainsi des résultats inverses de ceux escomptés : dans certains cas, il semblait y avoir plus d'hydrocarbures à la fin de l'expérience qu'au début.

3.2.2.2. Méthode gravimétrique.

La méthode de dosage retenue est celle de la pesée du résidu après évaporation du solvant.

L'évaporation du chloroforme se fait sous hotte obscure dans des capsules de verre préalablement tarées.

Le poids constant est atteint après 5 jours d'évaporation à la température du laboratoire.

La biodégradation est mesurée par différence entre les pesées des témoins stériles (évaporation seule) et des essais (évaporation + biodégradation).

La perte totale est calculée par la différence entre le poids d'origine (pétrole seul ou pétrole + additif) et le poids du résidu extrait au chloroforme.

La biodégradation est alors égale à la différence entre la perte totale et la perte par évaporation, soit du pétrole seul, soit du pétrole + additif.

3. 3. UTILISATION STATISTIQUE DES RESULTATS

L'expérience nous a montré qu'il y avait une assez grande dispersion dans les résultats de biodégradation quelles que soient les précautions prises.

C'est pourquoi, nous avons, pour chaque groupe, fait plusieurs répétitions afin de pouvoir effectuer une analyse de variance sur les résultats (test F, "variance ratio" de R. FISHER, LISON, 1968)*.

Pour nos premières expériences, nous avons fait 10 répétitions par essai. Cependant, nous avons constaté que 5 répétitions suffisaient, dans notre cas, pour obtenir des résultats statistiques fiables. Nous avons donc préféré faire plusieurs séries d'une même expérience, plutôt qu'une seule série avec un nombre de répétitions supérieur.

---

* groupe A : n_A données XA (somme = S XA) $\quad n = n_A + n_B$
groupe B : n_B données XB (somme = S XB)

- Variation entre groupes (essai)
  - somme des carrés des écarts sur la moyenne

$$S^2_E = \frac{(SXA)^2}{n_A} + \frac{(SXB)^2}{n_B} - \frac{(SX)^2}{n}$$

(si $n_A = n_B = n$: $S^2_E = \frac{(S\ XA - S\ XB)^2}{2n}$)

  - Degré de liberté D.L.:

D.L. = 1 (nombre de groupes - 1)

- Variation à l'intérieur des groupes (erreur)
  - Somme des carrés des écarts sur la moyenne

$$S^2_I = S\ (X_A - \overline{X}_A)^2 + S\ (X_B - \overline{X}_B)^2$$

  - Degré de liberté D.L = $(n_A - I) + (n_B - I)$

- Carré moyen = $\frac{\text{Somme des carrés}}{\text{D. L}}$

- Test F $\quad F = \frac{\text{carré moyen essai}}{\text{carré moyen erreur}}$

4. EXPERIMENTATION EN MILIEU AQUEUX

Les essais de laboratoire permettent de choisir sélectivement les paramètres dont on veut étudier l'influence. Tous les essais ont eu lieu en milieu aqueux suivant les techniques exposées au chapitre précédent.

On a étudié les facteurs suivants :

- Influence des produits additifs S 320 et F 72, en milieu contenant, ou non, du nitrate d'ammonium.
- Influence de l'inoculum.
- Influence des facteurs physicochimiques.

Ceux-ci comprennent l'agitation et l'aération du milieu, la composition du milieu de culture, la température et le pH.

Nous avons en outre apporté quelques éléments qualitatifs sur la biodégradation d'un pétrole brut par une analyse chromatographique des résidus pétroliers.

4.1. INFLUENCE DES PRODUITS S 320 et F 72. *

Ces produits additifs ont été conçus pour accélérer la dégradation d'hydrocarbures polluants, en apportant les éléments nutritifs qui sont généralement limitants dans un milieu naturel.

Ainsi l'azote et le phosphore sont apportés sous une forme organique telle qu'ils restent liés à l'hydrocarbure sans diffuser dans le milieu environnant.

En outre, ces produits émulsionnent les hydrocarbures, ce qui entraîne une surface de contact importante favorisant l'attaque microbienne qui se développe à l'interface eau-huile.

4.1.1. Composition chimique élémentaire des additifs.

4.1.1.1. S 320

S 320 est un produit à base naturelle (vinasses)qui contient environ 1,8% d'azote total et environ 0,48 % de phosphore total.

4.1.1.2. F 72

Il s'agit d'un produit de synthèse dont la composition est la suivante :

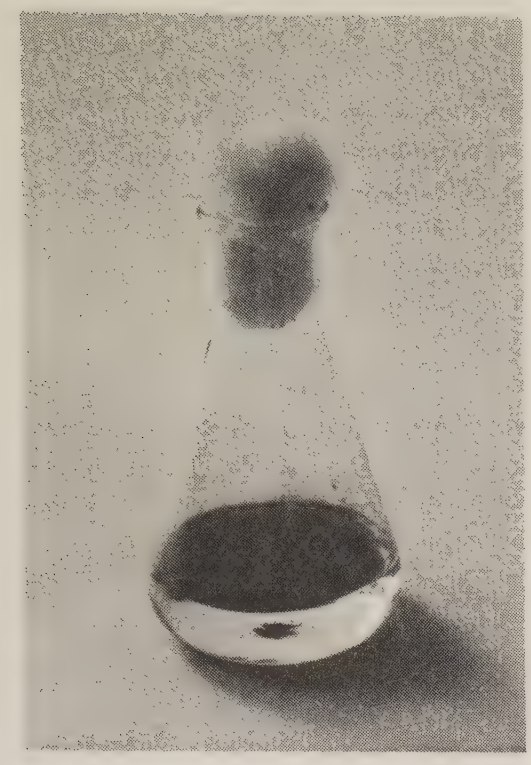
azote total : 1,6 %

phosphore total : 0,01 %

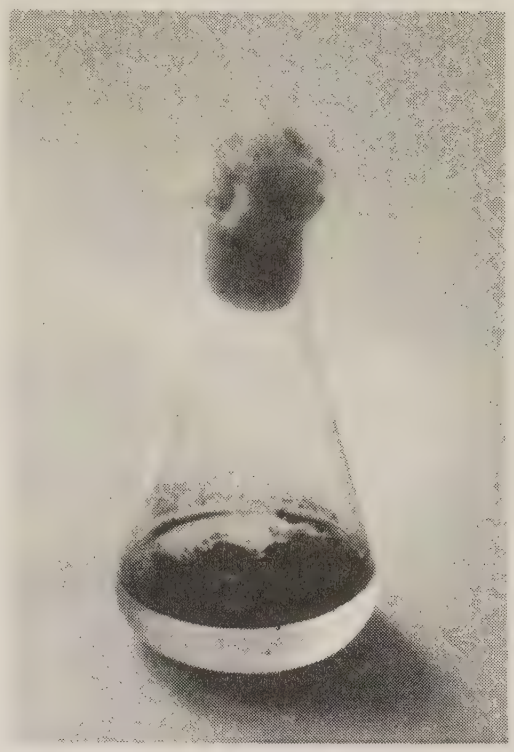
---

* FUSEY, OUDOT (1973) et FUSEY, LAMPIN,OUDOT (1975).

Cultures en fioles Erlenmeyer.
(après incubation de 21 jours à 30°C).



Témoin d'évaporation
(pétrole brut).



Biodégradation en milieu synthétique sans NO_3NH_4 ni additif.

Biodégradation avec F 72.

S 320, riche en phosphore, est prévu pour le sol où la demande biologique en phosphore est élevée. La rotation du phosphore en milieu "eau" (rivière, mer) est rapide. Ceci explique la très faible teneur en phosphore de F 72, destiné à cette application. On évite ainsi les phénomènes d'eutrophisation.

On utilise ces produits aux concentrations suivantes :

S 320 : 30% du poids d'hydrocarbure.

F 72 : 10% de F72, ou 30% de produit dilué au 1/3, du poids d'hydrocarbure.

4.1.2. Expérience I : influence de S 320, milieu avec azote(NO_3 NH_4).

Cette expérience montre l'influence du produit S 320, au cours d'une culture de 21 jours à 30°C, dans un milieu contenant du nitrate d'ammonium.

4.1.2.1. Protocole expérimental

- Milieu de KOUPENOV modifié complet (M.K.C.).
- Pétrole brut de Kuweit (PB)
- Inoculum d'Orange.
- Incubation 21 jours à 30°C
- Extraction au chloroforme
- Pesée du résidu après évaporation

On a utilisé 10 fioles par essai.

groupe A. Fioles A_1 à A_{10} : Témoins d'évaporation
100 ml MKC + 1 ml PB + Na N_3 10^{-2} M

groupe B. Fioles B_1 à B_{10} : Biodégradation naturelle
100 ml MKC + 1 ml PB + inoculum

groupe C. Fioles C_1 à C_{10} : Biodégradation avec S 320.
100 ml MKC + 1 ml PB + 0,3 ml S320 + inoculum

4.1.2.2. Résultats.
voir tableau 4.1.

4.1.2.3. Analyse de variance

a - groupe C/groupe B (S 320/PB).

	Somme des carrés	D.L.	carrés moyens
Essai	167 445	1	167 445
Erreur	47 784	18	2654,6

$F = 63,08^{**}$ ($F_{0,01}=8,28$) Différence hautement significative

Tableau 4.1.

Influence du S 320 en milieu avec NO_3 NH_4
Hydrocarbures consommés (%) en 21 jours à 30°C.

groupe	Fiole	Perte totale (%)	Perte totale moyenne (%)	Biodégradation moyenne (%)
A Témoin Evaporation	1	29,9	31,5	0
	2	29,8		
	3	32,7		
	4	33,6		
	5	32,8		
	6	29,5		
	7	34,3		
	8	29,6		
	9	33,9		
	10	20,9		
B PB	1	37,7	43,7	12,2
	2	38,7		
	3	37,6		
	4	46,7		
	5	57,3		
	6	45,3		
	7	40,7		
	8	41,2		
	9	42,9		
	10	48,8		
C S 320	1	59,1	62	30,5
	2	59,5		
	3	69,3		
	4	66,7		
	5	64,5		
	6	64,3		
	7	60,7		
	8	58		
	9	57,5		
	10	60,4		

N.B. Dans cette première expérience les résultats de biodégradation sont exprimés en % du poids initial de pétrole (0,8510 g). Cette mesure ne permet pas de préciser tous les paramètres (évaporation).

Les résultats suivants exprimeront la biodégradation par la différence entre la perte totale (poids d'origine pétrole ou pétrole + additif moins poids du résidu extrait) et la perte moyenne par évaporation de fioles témoins.

b - groupe A/ groupe B (témoin évaporation/PB).

	Somme des carrés	D.L.	carrés moyens
Essai	74420	1	74 420
Erreur expérimentale	37759	18	2097,72

$F = 35,47^{**}$ différence hautement significative

4.1.2.4. Interprétation

La biodégradation naturelle du pétrole brut en 21 jours à 30°C s'élève à 12,2 %.

Dans les mêmes conditions, la biodégradation avec S 320 atteint 30,5%, soit 2,5 fois plus; les différences sont hautement significatives.

4.1.3. Expérience II; influence de F 72, milieu avec azote (NO_3NH_4)

On a testé l'action du F 72, par rapport à la biodégradation naturelle, au cours d'une culture de 21 jours à 30°C, sans agitation ni aération, dans un milieu contenant NO_3NH_4.

4.1.3.1. Protocole expérimental.

- Milieu de KOUPENOV modifié complet MKC
- Pétrole brut de KUWEIT
- Inoculum d'Orange
- Incubation 21 jours à 30°C en étuve fixe
- Extraction au chloroforme
- Pesée du résidu

On a utilisé 10 fioles par essai.

groupe A. Fioles A_1 à A_{10} : Témoins d'évaporation
100 ml MKC + 1 ml PB + Na N_3 10^{-2} M

groupe B. Fioles B_1 à B_{10} : Biodégradation naturelle
100 ml MKC + 1 ml PB + inoculum

groupe C. Fioles C_1 à C_{10} : Biodégradation avec F 72
100 ml MKC + 1 ml PB + 0,3 ml F 72 dilué au 1/3 +inoculum

4.1.3.2. Résultats

voir tableau 4.2.

4.1.3.3. Analyse de variance

a. groupe A/ groupe B (évaporation/PB)

	somme des carrés	D.L.	Carré moyen
Essai	16 046 544	1	16 046 544
Erreur	9 153 55	17	53 844

$F = 298^{**}$ F (0,01) = 8,40 Différence hautement significative

Tableau 4.2.

Influence de F 72 en milieu avec NO_3NH_4

groupe		Perte totale (g)*	Biodégradation (g)**	Moyenne (g.)
A Témoin Evaporation PB	1	0,2294	0	0
	2	0,2660		
	3	0,2578		
	4	0,2668		
	5	0,2527		
	6	0,2461		
	7	0,2137		
	8	0,2621		
	9	0,2699		
	10	0,2814		
B PB	1	0,4268	0,1722	0,1840
	2	0,4462	0,1916	
	3	0,3895	0,1349	
	4	0,4819	0,2273	
	5	0,4581	0,2035	
	6	0,4469	0,1923	
	7	0,4220	0,1674	
	8	0,4497	0,1951	
	9	0,4267	0,1721	
	10	—	—	
C F 72	1	0,7995	0,3345	0,3184
	2	0,7699	0,3049	
	3	0,8174	0,3524	
	4	0,7769	0,3119	
	5	0,7878	0,3228	
	6	0,8078	0,3428	
	7	0,7907	0,3257	
	8	0,7206	0,2556	
	9	0,7892	0,3242	
	10	0,7743	0,3093	

* Perte totale: poids d'origine pétrole seul (0,8510g) ou pétrole + F 72 (1,1210 g) moins le poids du résidu extrait au chloroforme.

** Biodégradation : perte totale moins la perte moyenne par évaporation : Pétrole seul, : 0,2546 g
Pétrole + F72 : 0,4650 g

b. groupe B/groupe C (PB/F 72)

	Somme des carrés	D.L.	carré moyen
Essai	85 563	1	85 563
Erreur	11 678	17	686,9

$F = 124,5^{**}$ Différence hautement significative

4.1.3.4. Interprétation

L'évaporation du pétrole seul s'élève en 21 jours à 0,2546g(30% du poids initial). La biodégradation avec F 72(0,3184 g) est 1,8 fois plus élevée que la biodégradation naturelle (0,1840g).

4.1.4. Expérience III - Influence de F 72 et S 320 Milieu avec NO_3NH_4.

Dans cette expérience, on a vérifié et comparé l'influence des produits F 72 et S 320, par rapport à la biodégradation naturelle.

4.1.4.1. Protocole expérimental.

- Milieu de KOUPENOV modifié complet MPK
- Pétrole brut de Kuweit (PB)
- Inoculum d'Orange
- Incubation 21 jours à 30°C en étuve fixe
- Extraction au chloroforme
- Pesée du résidu

On a utilisé 5 fioles par essai.

groupe A. Fioles A_1 à A_5 : Témoins d'évaporation
100 ml MKC + 1ml PB + NaN_3 10^{-2M}

groupe B. Fioles B_1 à B_5 : Biodégradation naturelle
100 ml MKC + 1 ml PB + inoculum

groupe C. Fioles C_1 à C_5 : Biodégradation avec F 72
100 ml MKC + 1ml PB + 0,3 ml F72 dilué au 1/3 +inoculum

groupe D. Fioles D_1 à D_5 : Biodégradation avec S 320
100 ml MKC + 1 ml PB + 0,3 ml S320 + inoculum

4.1.4.2. Résultats.

Voir tableau 4.3.

4.1.4.3. Analyse de variance

a. groupe B/groupe C (PB/F72)

	somme des carrés	D.L.	carré moyen
essai	6 691 240	1	6 691 240
erreur	6 43 113	8	80 389,1

$F = 83,2^{**}$ ($F_{0,01} = 11,26$) Différence hautement significative

b. groupe B/groupe D (PB/S 320)

	somme des carrés	D.L.	carré moyen
essai	44 55 62	1	4 455 562
erreur	6 07 241	8	75 905,1

$F = 58,69^{**}$ Différence hautement significative

c. groupe C/groupe D (F72/S 320)

	somme des carrés	D.L.	carré moyen
Essai	226 503	1	226 503
Erreur	740 660	8	9258,5

F = 2,44 (F 0,05 = 5,32) Différence non significative

Tableau 4.3.

Influence de F72 et S320 en milieu avec NO_3NH_4

groupe		perte totale (g)	Biodégradation (g)	Moyenne (g)
A Témoin Evaporation PB	A_1	0,3145	0	0
	A_2	0,3184		
	A_3	0,3147		
	A_4	0,3054		
	A_5	0,2968		
B PB	B_1	0,4693	0,1593	0,1702 g
	B_2	0,4868	0,1768	
	B_3	0,5171	0,2071	
	B_4	0,4795	0,1695	
	B_5	0,4482	0,1382	
C F 72	C_1	0,7899	0,3249	0,3338 g
	C_2	0,8504	0,3854	
	C_3	0,7713	0,3063	
	C_4	0,7796	0,3146	
	C_5	0,8028	0,3378	
D S 320	D_1	0,8618	0,3244	0,3037 g
	D_2	0,8018	0,2644	
	D_3	0,8191	0,2817	
	D_4	0,8501	0,3127	
	D_5	0,8725	0,3351	

poids d'origine (g) PB seul 0,8510
PB + F72 1,1210
PB + S320 1,1510

perte moyenne par évaporation(g) PB seul 0,3100
PB + F72 0,4650
PB + S320 0,5374

4.1.4.4. Interprétation

La biodégradation naturelle, en 21 jours à 30°C (milieu avec NO_3 NH_4), atteint 0,1702 g. Elle est 1,9 fois plus élevée avec les additifs (F72: 0,3338; S320: 0,3037). Il n'y a pas de différence significative entre l'action des deux produits.

4.1.5. Expérience IV. Influence de F72 et S320.
Milieu sans NO_3 NH_4 (voir aussi 4.3.2.)

Cette expérience est analogue à la précédente, mais se déroule dans un milieu de KOUPENOV modifié sans NO_3NH_4 (Milieu de KOUPENOV incomplet : MKI).

On utilise en outre un inoculum mixte (IM) qui est un mélange des inoculums d'Orange, de la Chênaie et de la Courneuve.

4.1.5.1. Protocole expérimental.

- Milieu de KOUPENOV modifié sans azote
- Pétrole brut de Kuweit
- Inoculum mixte
- Extraction au chloroforme et pesée du résidu
- 5 fioles par test.

groupe A: Fioles A_1-A_5 : Témoin d'évaporation PB seul
100 ml eau distillée + 1ml PB + NaN_3

groupe B: Fioles B_1-B_5 : Témoin d'évaporation PB + S320
100 ml ED + 1 ml PB + 0,3 ml S320 + NaN_3

groupe C: Fioles C_1-C_5 : Témoin d'évaporation PB + F72
100 ml ED + 1 ml PB + 0,1 ml F72 dilué au 1/3 + NaN_3

groupe D: Fioles D_1-D_5 : Biodégradation naturelle
100 ml MKI + 1 ml PB + inoculum mixte

groupe E: Fioles E_1-E_5 : Biodégradation avec S320
100 ml MKI + 1 ml PB + 0,3 ml S320 + inoculum mixte

groupe F: Fioles F_1-F_5 : Biodégradation avec F72
100 ml MKI + 1 ml F72 dilué au 1/3 + inoculum mixte

4.1.5.2. Résultats

Voir tableau 4.4.

4.1.5.3. Analyse de variance

Tableau 4.4.

Influence de F72 et S320

milieu sans NO_3NH_4

Groupe		Perte totale (g)	Biodégradation (g)	Moyenne (g)
A Evaporation PB	1	0,2624	0	0
	2	0,2691		
	3	0,2607		
	4	0,2513		
	5	0,2659		
B Evaporation S 320	1	0,5557	0	0
	2	0,5431		
	3	0,5352		
	4	0,5273		
	5	0,5255		
C Evaporation F 72	1	0,2734	0	0
	2	0,2797		
	3	0,3154		
	4	0,2840		
	5	0,3126		
D PB	1	0,2832	0,0213	0,0220
	2	0,2846	0,0227	
	3	0,2797	0,0178	
	4	0,2837	0,0218	
	5	0,2883	0,0264	
E S320	1	0,6664	0,1290	0,1432
	2	0,6802	0,1428	
	3	0,6724	0,1350	
	4	0,6913	0,1539	
	5	0,6926	0,1552	
F F 72	1	0,3730	0,0800	0,0753
	2	0,3566	0,0636	
	3	0,3813	0,0883	
	4	0,3570	0,0640	
	5	0,3736	0,0806	

Poids d'origine (g) PB seul 0,8510
PB + F 72 0,9410
PB + S 320 1,1510

Pertes moyennes par évaporation (g) PB seul 0,2619
PB + F72 0,2930
PB + S320 0,5374

a. groupe D/groupe E (PB/S320

	somme des carrés	D.L.	Carré moyen
Essai	3 672 360	1	3.672 360
Erreur	56 555	8	7069,4

F = 519,47** (F0,01 = 11,26) Différence hautement significative.

b. groupe D/groupe F (PB/F72)

	somme des carrés	D.L	Carré moyen
Essai	710 223	1	710 223
Erreur	35278	8	4409,8

F = 161,05** Différence hautement significative

c. groupe E/groupe F (F 72/S 320)

	somme des carrés	D.L.	Carré moyen
Essai	1 152 603	1	1.152 603
Erreur	84 229	8	10 528,6

F = 109,47**

4.1.5.4. Interprétation

En milieu sans azote (NO_3NH_4), la biodégradation naturelle est très faible (de l'ordre de 3%): 0,0220g . Elle atteint 0,1432 g avec S320 (6,5 fois plus) et 0,0753 g avec F72 (3,4 fois plus).

4.1.6. Expérience V : Influence de F72 et S320 en eau de Seine.

Cette expérience a été montée pour vérifier l'action des produits F72 et S320, en milieu naturel, et non plus en milieu de culture.

L'eau de Seine a été prélevée en hiver (novembre). Elle a été simplement filtrée (filtre Laurent) mais non stérilisée. On n'a ajouté aucun inoculum, les bactéries présentes dans l'eau de Seine en tenant lieu.

4.1.6.1. Protocole expérimental.

- Milieu : eau de Seine filtrée (E.S.)
- Pétrole brut de Kuweit (PB)
- Pas d'inoculum
- Incubation 21 jours à 30°C en étuve fixe
- Extraction au chloroforme
- Pesée du résidu

On a utilisé 5 fioles par test.

groupe A : Fioles A_1 à A_5 : Témoins d'évaporation (PB + F72)
100 ml ES + 1 ml PB + 0,3 ml F72 + NaN_3

groupe B : Fioles B_1 à B_5 : Biodégradation naturelle
100 ml ES + 1 ml PB

groupe C : Fioles C_1 à C_5 : Biodégradation avec F72
100 ml ES + 1 ml PB + 0,3 ml F72 dilué au 1/3

groupe D : Fioles D_1 à D_5 : Biodégradation avec S320
100 ml ES + 1 ml PB + 0,3 ml S320

4.1.6.2. Résultats

Voir tableau 4.5, p. 51.

4.1.6.3. Analyse de variance

a. groupe B/groupe C (PB/F72)

	somme des carrés	D.L	Carré moyen
Essai	686 440	1	686 440
Erreur	194 737	8	24342,13

F = 28,20** (F 0,01 = 11,26) Différence hautement significative

b. groupe B/groupe D (PB/S320)

	somme des carrés	D.L	Carré moyen
Essai	8 208 360	1	8 208 360
Erreur	92 45I	8	11556,4

F = 710,28**

c. groupe C/groupe D (F72/S320)

	somme des carrés	D.L	Carré moyen
Essai	4 147 360	1	4 147 360
Erreur	223 718	8	27 964,8

F = 148,30**

4.1.6.4. Interprétation

La biodégradation naturelle du pétrole en eau de Seine, sans inoculum, est très faible : 0,0046 g. Elle atteint 0,0570 g avec F72 (12,4 fois plus) et 0,1858 g avec S320 (40 fois plus).

Ces résultats sont comparables à ceux obtenus en milieu minéral sans NO_3NH_4. Ceci montre que la microflore adaptée à la dégradation des hydrocarbures est présente dans ce milieu naturel(*). Elle est cependant inefficace à cause du manque d'azote assimilable.

(*) Vérifié par des dénombrements flore totale-flore adaptée, effectués au Museum National d'Histoire Naturelle.

Tableau 4.5.

Influence de F72 et S320 en eau de Seine

Groupe		Perte totale (g)	Biodégradation (g)	Moyenne
A Evaporation PB + F72	1	0,4889	0	0
	2	0,4721		
	3	0,4715		
	4	0,4702		
	5	0,4747		
B PB	1	0,2626	0	0,0046
	2	0,2437	0	
	3	0,2656	0,0016	
	4	0,2621	0	
	5	0,2855	0,0215	
C F72	1	0,5334	0,0579	0,0570
	2	0,5595	0,0840	
	3	0,5288	0,0533	
	4	0,5038	0,0283	
	5	0,5373	0,0617	
D S320	1	0,7340	0,1966	0,1858
	2	0,7248	0,1874	
	3	0,7106	0,1732	
	4	0,7097	0,1723	
	5	0,7369	0,1995	

Poids d'origine (g) PB seul = 0,8510
PB + F72 = 1,1210
PB + S320 = 1,1510

Pertes moyennes par évaporation (g) PB seul : 0,2640
PB + F72 : 0,4755
PB + S320 : 0,5374

4.1.7. Discussion des résultats et conclusions

On trouve, dans la littérature, plusieurs travaux concernant la biodégradation du pétrole brut.

Les valeurs indiquées varient dans des proportions importantes : de quelques % en un mois à 50% en 20 heures (DAVIS,1967).

Par exemple, le Field Research Laboratory de la Socony Mobil Oil Company a obtenu la dégradation de 50% d'un pétrole, en deux semaines dans un milieu minéral agité contenant 1% de pétrole brut.

Il faut cependant noter que certaines valeurs citées semblent très optimistes. En effet, plusieurs auteurs ne mentionnent pas la perte dûe à l'évaporation. Or nos travaux ont montré que dans nos conditions expérimentales, celle-ci atteignait 30 à 40% du poids initial de pétrole.

La biodégradation doit être mesurée en tenant compte de l'évaporation qui n'est pas liée au système biologique d'épuration.

Pour notre part, nous obtenons les résultats suivants :

La biodégradation naturelle de 0,8510 g(1ml) de pétrole brut de Kuweit, en 21 jours à 30°C, sans agitation ni aération est de l'ordre de 0,18g, par rapport aux témoins d'évaporation.

Ces résultats sont obtenus avec un inoculum sélectionné, contenant des souches adaptées à la biodégradation du pétrole brut, et dans un milieu minéral complet, contenant de l'azote assimilable en quantité suffisante.

La biodégradation obtenue dans les mêmes conditions, avec les additifs F72 et S320 est 1,8 à 2,5 fois plus élevée.

On note l'importance de l'azote. Dans le milieu synthétique sans nitrate d'ammonium, ou en eau de Seine, la biodégradation naturelle est très faible (0,010g). Elle est 4 à 40 fois plus élevée avec les additifs.

En résumé, dans tous les cas, la biodégradation est augmentée de façon hautement significative par l'apport de F72 ou de S320.

L'expérience montre que, dans un milieu naturel, l'addition d'un produit tel que le F72 ou le S320 apporte une quantité d'azote, sous une forme convenable, suffisante pour permettre le phénomène de la biodégradation des hydrocarbures par les bactéries présentes dans ce milieu naturel.

4.2. INFLUENCE DE L'INOCULUM.

On a voulu déterminer le rôle de la composition des inoculums utilisés au laboratoire sur la biodégradation.

On a vu en effet (cf.2.3.5.) que les bactéries constituant les inoculums d'Orange et de la Chênaie différaient en genres et en pourcentage de genres. On a donc comparé les résultats obtenus par ces deux inoculums.

D'autre part, on a comparé l'action de l'inoculum mixte obtenu en mélangeant les inoculums d'Orange, de la Chênaie et de la Courneuve, à l'action d'un inoculum commercial.

Cet inoculum, que nous appellerons I.C., se présente sous forme lyophiliséeet est destiné à ensemencer un milieu pollué pour dégrader les hydrocarbures.

4.2.1. Comparaison des inoculums d'Orange et de la Chênaie.

On a comparé l'action de ces inoculums dans un milieu contenant de l'azote et du F72.

4.2.1.1. Protocole expérimental

- Milieu de KOUPENOV modifié complet MKC
- Pétrole brut de Kuweit
- Inoculum d'Orange-inoculum de la Chênaie
- Incubation 21 jours à 30°C
- Extraction au chloroforme et pesée du résidu.

On a utilisé 5 fioles par essai.

groupe A: Fioles A_1 à A_5 : inoculum d'Orange
100 ml MKC + 1ml PB+0,3 ml F72 + inoculum d'Orange

groupe B: Fioles B_1 à B_5: inoculum de la Chênaie
100 ml MKC + 1ml PB + 0,3ml F72 + inoculum de la Chênaie.

4.2.1.2. Résultats

Voir tableau 4.6

Tableau 4.6.

Biodégradation du pétrole brut:
Comparaison inoculum d'Orange-inoculum de la Chênaie.

groupe		Perte totale (g)	Biodégradation (g)	Moyenne (g)
A inoculum Orange	1	0,6039	0,1329	0,1261
	2	0,6022	0,1312	
	3	0,6057	0,1347	
	4	0,6000	0,1290	
	5	0,5736	0,1026	
B inoculum La Chênaie	1	0,6051	0,1341	0,1359
	2	0,6364	0,1654	
	3	0,5944	0,1234	
	4	0,5975	0,1265	
	5	0,6010	0,1300	

Poids d'origine (g) PB + F72 1,1210

Perte moyenne par évaporation (g) PB + F72 0,4710

4.2.1.3. Analyse de variance.

groupe A/groupe B (F72/S320).

	somme des carrés	D.L.	carrés moyens
Essai	24010	1	24010
Erreur	185 978	8	2327,3

F = 1,03 (F 0,05 = 5,32) Différence non significative

4.2.1.4. Interprétation.

Il n'y a pas de différence significative entre l'action des deux inoculums.

4.2.2. Comparaison inoculum mixte-inoculum commercial.

On a voulu déterminer l'influence de ces deux inoculums sur la biodégradation des hydrocarbures, avec et sans F72 et S320.

4.2.2.1. Protocole expérimental.

Dans cette expérience, on a utilisé le milieu de KOUPENOV modifié sans azote : milieu de KOUPENOV incomplet (MKI).

. Pétrole brut de Kuweit
. Inoculum mixte (IM)-inoculum commercial (I-C)
. Incubation 21 jours à 30°C en étuve fixe.
. Extraction au chloroforme et pesée du résidu.

groupe A : Fioles A_1 à A_5: Biodégradation naturelle avec inoculum mixte.

100 ml MKI + 1ml PB + IM.

groupe B : Fioles B_1 à B_5 : Biodégradation naturelle avec inoculum commercial.

100 ml MKI + 1ml PB + IC.

groupe C : Fioles C_1 à C_5 : Biodégradation IM avec S320.

100 ml MKI + 1ml PB + 0,3ml S320 + IM.

groupe D : Fioles D_1 à D_5 : Biodégradation IC avec S320

100 ml MKI + 1ml PB + 0,3ml S320 + IM.

groupe E : Fioles E_1 à E_5 : Biodégradation IM avec F72

100 ml MKI + 1ml PB + 0,1ml F72 + IM

groupe F : Fioles F_1 à F_5 : Biodégradation IC avec F72

100 ml MKI + 1ml PB + 0,1 ml F72 + IM.

4.2.2.2. Résultats

Voir tableau 4.7, p. 56.

4.2.2.3. Analyse de variance

Voir tableau 4.8, p. 57.

4.2.2.4. Interprétation

La biodégradation naturelle (milieu sans NO_3 NH_4) est très faible (0,0208 avec IM; 0,0053 avec IC). Avec S320, on obtient 0,1577 (I.M) soit 7,6 fois plus et 0,0841 (IC), soit 15,9 fois plus. Avec F72, la biodégradation est respectivement 3,4 (IM) et 12 fois plus élevée (IC).

La biodégradation obtenue avec l'inoculum mixte que nous avons sélectionné au laboratoire est supérieure à celle que l'on obtient avec l'inoculum commercial. La différence est hautement significative avec S320, significative sans additif, et non significative avec F72.

4.2.3. Discussion des résultats et conclusions.

De ce qui précède, nous pouvons déduire qu'une partie de la microflore présente dans un sol pollué s'adapte à la dégradation des hydrocarbures.

Malgré les compositions différentes des inoculums testés (Orange-la Chênaie), les résultats sont très comparables. Ceci tend à indiquer que le phénomène de biodégradation suit un processus global, faisant intervenir un grand nombre d'espèces différentes de microorganismes.

Tableau 4.7.

Biodégradation d'un pétrole en milieu minéral sans NO_3NH_4.

Comparaison inoculum mixte-inoculum commercial avec et sans F72 et S320.

groupe		Perte totale (g)	Biodégradation (g)	Moyenne
A PB + IM	1	0,2847	0,0294	0,0208
	2	0,2625	0,0072	
	3	0,2784	0,0231	
	4	0,2849	0,0296	
	5	0,2702	0,0149	
B PB + IC	1	0,2701	0,0148	0,0053
	2	0,2587	0,0034	
	3	0,2634	0,0081	
	4	0,2550	0,0000	
	5	0,2548	0,0000	
C S 320 + IM	1	0,6787	0,1413	0,1577
	2	0,7157	0,1783	
	3	0,6910	0,1536	
	4	0,7020	0,1646	
	5	0,6882	0,1508	
D S 320 + IM	1	0,6258	0,0884	0,0841
	2	0,6177	0,0803	
	3	0,6320	0,0948	
	4	0,6074	0,0700	
	5	0,6246	0,0872	
E F72 + IM	1	0,3609	0,0679	0,0707
	2	0,3666	0,0736	
	3	0,3566	0,0636	
	4	0,3685	0,0755	
	5	0,3660	0,0730	
F F 72 + IC	1	0,3552	0,0622	0,0634
	2	0,3319	0,0389	
	3	0,3614	0,0684	
	4	0,3532	0,0602	
	5	0,3801	0,0871	

Poids initial (g) PB : 0,8510
PB+F72 : 0,9410
PB+S320: 1,1510

Evaporation moyenne (g) PB : 0,2553
PB+F72 : 0,2930
PB+S320 : 0,5374

Tableau 4.8.

Analyse de variance

Comparaison Inoculum mixte-inoculum commercial

groupes		Somme des carrés	D.L	Carré moyen/test
A/B	Essai	60063	1	60063
	Erreur	53434	8	6679,25
	F= 8,99* (FO,01=11,26) (FO,05= 5,32			(significatif)
C/D	Essai	1 354 240	1	1354 240
	Erreur	11 6119	8	14514,87
	F= 93,29**			(hautement significatif)
E/F	Essai	13323	1	13 323
	Erreur	73429	8	9178,62
	F= 1,45			(Non significatif)
C/E	Essai	189 2250	1	1892250
	Erreur	90 034	8	11 254,25
	F= 168,14**			(hautement significatif)
D/F	Essai	107 123	1	107 123
	Erreur	99 514	8	12 439,25
	F= 8,61*			(significatif)
A/C	Essai	4 685 403	1	4 685 403
	Erreur	118 181	8	14 772,62
	F= 317,2**			(hautement significatif)
A/E	Essai	622 503	1	622 503
	Erreur	47 145	8	5 893,12
	F= 105,63**			(hautement significatif)

Il semble donc qu'il suffit d'apporter à la microflore adaptée les éléments nutritifs qui sont nécessaires à son développement.

4.3. INFLUENCE DES FACTEURS PHYSICO-CHIMIQUES.

4.3.1. Influence de l'agitation et de l'aération.

L'oxydation des hydrocarbures est généralement un phénomène aérobie qui demande de l'oxygène (DAVIS, 1967).

Nous avons voulu déterminer si une aération forcée jouait un rôle favorable ou non sur la biodégradation des produits pétroliers.

On a donc réalisé des essais en fioles agitées, ainsi que des essais en milieu aéré par barbotage d'air stérile.

4.3.1.1. Influence de l'agitation.

a - Protocole expérimental.

Le protocole expérimental est rigoureusement identique à celui décrit pour l'expérience III (cf.4.1.4.). Les fioles ont été mises à incuber sur agitateur rotatif (90 t/mn) pendant 21 jours à 30°C.

- Milieu de KOUPENOV modifié complet.
- Pétrole brut de Koweit
- Inoculum d'Orange
- Incubation 21 jours à 30°C sur agitateur rotatif.
- Extraction au chloroforme et pesée du résidu
- 5 fioles par essai.

groupe A' : Fioles A_6 à A_{10} : Témoins d'évaporation
100 ml MKC + 1 ml PB + NaN_3 $10^{-2}M$

groupe B' : Fioles B_6 à B_{10} : Biodégradation naturelle
100 ml MKC + 1 ml PB + inoculum

groupe C' : Fioles C_6 à C_{10} : Biodégradation avec F72
100 ml MKC + 1 ml PB + 0,3 ml F72 au 1/3 + inoculum

groupe D' : Fioles D_6 à D_{10} : Biodégradation avec S320
100 ml MKC + 1 ml PB + 0,3 ml S320 + inoculum

b - résultats

Voir tableau 4.9. Se reporter aussi au tableau 4.3

c - Analyse de variance

. Dans l'expérience avec agitation

B'/C' (PB/F72)

Tableau 4.9

Influence de l'agitation sur la biodégradation d'un pétrole brut.

groupe		Perte totale(g)	Biodégradation(g)	Moyenne(g)
A' témoin Evaporation	6	0,3757		
	7	0,3656		
	8	0,3635		
	9	0,3951		
	10	0,3579		
B' PB	6	0,4411	0,0695	0,0652
	7	0,4654	0,0938	
	8	0,4492	0,0776	
	9	0,4059	0,0343	
	10	0,4222	0,0506	
C' F72	6	0,7184	0,1613	0,1779
	7	0,7483	0,1912	
	8	0,7453	0,1882	
	9	0,7143	0,1572	
	10	0,7485	0,1914	
D' S320	6	0,7913	0,1475	0,1365
	7	0,7858	0,1420	
	8	0,8019	0,1581	
	9	0,7675	0,1237	
	10	0,7550	0,1112	

Poids d'origine	PB seul	0,8510 g
	PB + F72	1,1210 g
	PB + S320	1,1510 g
Perte moyenne par évaporation	PB seul	0,3716
	PB + F72	0,5571
	PB + S320	0,6438

	Somme des carrés	D.L	Carré moyen
Essai	317 53 22	1	317 53 22
Erreur	332 746	8	415 93,25

F= 76,34** (F 0,01 = 11,26) Différence hautement significative.

B'/D' (PB/S320)

	Somme des carrés	D.L	Carré moyen
Essai	127 09 23	1	127 09 23
Erreur	357 992	8	44 749

F= 28,40** Différence hautement significative.

C'/D' (F72/S320)

	Somme des carrés	D.L.	Carré moyen
Essai	42 84 90	1	42 84 90
Erreur	259 102	8	32 388

F='13,23** Différence hautement significative

. Comparaison avec agitation-sans agitation

groupe A/groupe A' (Evaporation PB)

	Somme des carrés	D.L	Carré moyen
Essai	94 86 40	1	948 640
Erreur	116 666	8	14 583,25

F= 65,01** (F0,01 = 11,26) Différence hautement significative

Toutes les différences : - Biodégradation naturelle (B/B')
- Biodégradation avec F72 (C/C')
- Biodégradation avec S320 (D/D')

sont hautement significatives.

d - interprétation

La biodégradation naturelle en fioles agitées est de 0,0652 g Elle s'élève à 0,1779g avec F72 (2,8 fois plus) et à 0,1365g (2,1 fois plus) avec S320.

e - discussion

Toutes les biodégradations obtenues en fioles agitées sont très nettement inférieures à celles obtenues en fioles non agitées

(Biodégradation naturelle 2,6 fois moins importante)
(Biodégradation avec F72 1,9 " " ")
(Biodégradation avec S320 2,3 " " ")

Ceci est dû à deux causes principales.

1)- L'évaporation est plus importante dans les fioles agitées (0,3716 g contre 0,3100 g).

2)- Le pétrole se dépose sur les parois des fioles au cours de l'agitation rotative, et n'est plus en contact avec le milieu de culture.

4.3.1.2. Influence de l'aération

Pour éviter le phénomène de dépôt, on a procédé à deux séries d'expériencesen récipients non agités mais aérés par barbotage d'air comprimé stérile.

a - Expérience 1

Cette expérience a été montée en fioles Erlenmeyers de 1000 ml, avec du pétrole brut sans additif.

- sans aération
  E4 : Témoin d'évaporation
  500 ml de milieu de KOUPENOV complet + 4,255g (5ml) de pétrole brut + NaN_3.
  E2 : Biodégradation
  500 ml MKC + 4,255 g PB + inoculum
- avec aération (90 litres air/heure).
  E3 : Témoin d'évaporation identique à E4
  E1 : Biodégradation identique à F2

Incubation : 21 jours à 22°C.

Il n'a pas été possible de faire de répétitions

- Résultats. Tableau 4.10

		Perte totale (g)	Biodégradation (g)
sans aération	E_4	1,2410	0
	E_2	1,9068	0,6658
avec aération	E_3	1,5210	0
	E_1	1,7381	0,2171

- Interprétation :

L'aération favorise l'évaporation et le départ de fractions rapidement biodégradables. La biodégradation s'en trouve donc apparemment diminuée.

b - Expérience 2

Cette expérience a été montée en fermenteurs de laboratoire de 1000 ml (Mini-Ferm, New Brunswick) avec du pétrole brut + F72.

L'incubation a duré 21 jours à 30°C.

Le milieu a été aéré (90 litres air/heure) et agité périodiquement, de façon discontinue.

F_1 : Evaporation PB

500 ml MKC + 4,3050 g PB + NaN_3

F_2 : Evaporation PB + F72

500 ml MKC + 4,3050 g PB + 1,189g F72 dilué au 1/3 + NaN_3.

F_3 : Biodégradation PB

500 ml MKC + 4,3050g PB + inoculum mixte

F_4 : Biodégradation PB + F72

500 ml MKC + 4,3050g PB + 1,189g F72 dilué au 1/3 + inoculum.

. Résultats = Tableau 4.11

	Perte totale(g)	Biodégradation(g)
F_1	1,9296	0
F_2	2,4613	0
F_3	2;3693	0,4397
F_4	3,5445	1,1832

La biodégradation naturelle est de 0,4397 g, soit, si l'on rapporte à 100 ml de milieu et 1ml de PB :0,0879g. Cette valeur est inférieure à celle obtenue dans les expériences sans aération (Rappelons qu'en milieu complet non aéré, la biodégradation naturelle moyenne atteint 0,18g). La biodégradation avec F72 est 2,6 fois plus élevée. Elle s'élèverait à 0,2366g pour 100 ml de milieu, valeur inférieure à celle obtenue en milieu complet non aéré (0,32g).

4.3.1.3. Discussion des résultats et conclusions

Dans tous les cas, l'agitation et l'aération du milieu de culture conduisent à des résultats de biodégradation inférieurs à ceux enregistrés en milieu non aéré.

Nous pensons que ceci s'explique surtout par le fait que l'aération du milieu de culture accroît sensiblement l'évaporation (en moyenne 0,38g contre 0,29g).

Ce sont les fractions à bas point d'ébullition (paraffiniques et aromatiques) qui sont ainsi éliminées. Or nous savons que ces fractions sont les plus rapidement biodégradables (cf.2.1.2 et 4.4.2).

L'agitation ou l'aération forcée n'ont pas été jugées favorables pour la lecture des résultats de laboratoire.

Toutes nos expériences ont donc été réalisées en incubation statique, sans aération.

4.3.2. Influence de la composition du milieu de culture.

On a retiré successivement les composants du milieu de KOUPENOV modifié complet, de façon à déterminer l'importance relative de chacun d'entre eux (voir tableau 2.4 p. 17).

4.3.2.1. Protocole expérimental.

Les essais réalisés ont été ainsi répertoriés:

groupe A :	fioles A_1 à A_5	: Milieu complet
groupe B :	fioles B_1 à B_5	: Milieu sans solution tampon
groupe C :	" C_1 à C_5	: " " magnésium
groupe D :	" D_1 à D_5	: " " ammonium
groupe E :	" E_1 à E_5	: " " oligo éléments
groupe F :	" F_1 à F_5	: " " fer ni calcium
groupe G :	" G_1 à G_5	: " " extrait de levure

Dans chaque fiole Erlenmeyer de 250 ml,on dispose:

100 de milieu complet ou non + 1ml PB + 0,3ml F72 dilué au 1/3 + inoculum d'Orange.

- Incubation 45 jours à 30°C
- Extraction au chloroforme et pesée du résidu.

4.3.2.2. Résultats

Voir tableau 4.12 , p. 65

4.3.2.3. Analyse de variance

Voir tableau 4.13, p.66

4.3.2.4. Discussion des résultats et conclusions

On peut classer les composants du milieu synthétique par ordre d'importance décroissante :

- SO_4 Mg (hautement significatif)
- Tampon phosphate (hautement significatif)
- NO_3NH_4 (hautement significatif)
- Oligo-éléments (hautement significatif)
- Extrait de levure (significatif)
- Cl_2Ca, SO_4 Fe (non significatif)

L'influence du magnésium est particulièrement remarquable. Mg intervient comme cofacteur de réaction enzymatique (ATP). Dans un milieu naturel, ce métal se trouve généralement en quantité suffisante.

Nous pensons que l'influence du tampon phosphate est essentiellement dûe au maintien d'un pH convenable dans un milieu fermé ayant tendance à s'acidifier par les produits du métabolisme bactérien.

Dans le cas de l'expérience, l'influence du nitrate d'ammonium, quoique hautement significative, est relativement faible. Ceci est dû au fait que le milieu contient du F72 qui apporte déjà de l'azote sous une forme assimilable.

Les autres composants ont une influence beaucoup plus restreinte. Les oligo-éléments font apparaître une différence hautement significative, l'extrait de levure une différence significative, et les éléments fer et calcium une différence non significative.

Tableau 4. 12

Influence de la composition du milieu de culture

Groupe		Perte totale	Biodégradation	Moyenne
A M.K.C.	1	0,7359	0,2564	0,2916
	2	0,7635	0,3040	
	3	——	——	
	4	0,7749	0,2954	
	5	0,7902	0,3107	
B - Tampon PO_4	1	0,5792	0,0997	0,1131
	2	0,5813	0,1018	
	3	0,6128	0,1333	
	4	0,6173	0,1378	
	5	0,5726	0,0931	
C -Mg	1	0,5487	0,0692	0,0743
	2	0,5586	0,0791	
	3	0,5430	0,0635	
	4	0,5391	0,0796	
	5	0,5394	0,0799	
D - NO_3 NH_4	1	0,6613	0,1818	0,2093
	2	0,7142	0,2347	
	3	0,7151	0,2356	
	4	0,7001	0,2206	
	5	0,6535	0,1740	
E -oligo éléments	1	0,6994	0,2199	0,2302
	2	0,7297	0,2502	
	3	0,6857	0,2062	
	4	0,7254	0,2499	
	5	0,7181	0,2236	
F -Fe,Ca	1	0,7014	0,2219	0,2536
	2	0,7281	0,2486	
	3	0,7629	0,2834	
	4	0,7537	0,2742	
	5	0,7194	0,2991	
G -Extrait de levure	1	0,7113	0,2318	0,2469
	2	——	——	
	3	0,7547	0,2752	
	4	0,7335	0,2540	
	5	0,7061	0,2266	

Poids initial (g) pétrole seul : 0,8510
pétrole + F72 : 1,1210

évaporation moyenne (g) PB : 0,3249
PB + F72 : 0,4755

Tableau 4.13

Analyse de variance - Composition du milieu de culture

Groupes		Somme des carrés	D.L.	Carrés moyens/test
A/B	Essai	710 9006,2	1	7109006,2
	Erreur	34 9743	7	49963,28
	F=142,28**			
	F(0,01)= 12,25			Hautement significatif
A/C	Essai	10624339	1	10624339
	Erreur	199719	7	28531,28
	F=372,37**			Hautement significatif
A/D	Essai	1523990,2	1	1523990,2
	Erreur	523893	7	74841,85
	F=20,36**			Hautement significatif
A/E	Essai	848241	1	848241
	Erreur	310319	7	44331,28
	F=19,13**			Hautement significatif
A/F	Essai	324900	1	324900
	Erreur	430203	7	61457,57
	F= 5,28			
	F(0,05)= 5,39			Non significatif
A/G	Essai	399618	1	399618
	Erreur	326355	6	54392,5
	F=7,34*			
	F(0,01)= 13,74			significatif
	F(0,05)= 5,99			

4.3.3. Influence de la température.

On a cherché à déterminer l'influence du facteur température sur les résultats de biodégradation.

On a donc réalisé une série d'expériences dans une gamme allant de 4°C à 60°C.

4.3.3.1. Protocole expérimental.

Les températures choisies sont: 4,10,20,30,40,50 et 60°C. Pour chaque expérience on a préparé des témoins d'évaporation pétrole seul et pétrole + F72. On a utilisé le milieu minéral incomplet (sans NO_3NH_4).

A 4°C

- groupe 1 : fioles 1.1 à 1.5, témoins d'évaporation PB
  100 ml eau distillée + 1ml PB + NaN_3 10^{-2M}
- groupe 2 : fioles 2.1 à 2.5, biodégradation pétrole seul
  100 ml MKI + 1ml PB + inoculum mixte.
- groupe 3 : fioles 3.1 à 3.5, témoins d'évaporation PB + F72
  100 ml eau distillée + 1ml PB + 0,1ml F72+NaN_3 10^{-2M}
- groupe 4 : fioles 4.1 à 4.5, biodégradation PB + F72
  100 ml MKI + 1 ml PB + 0,1ml F72 + inoculum mixte

La préparation des fioles est identique pour les autres températures étudiées :

- A 10°C: groupes 5,6,7,8
- A 20°C: " 9,10,11,12
- A 30°C: " 13,14,15,16
- A 40°C: " 17,18,19,20
- A 50°C: " 21,22,23,24
- A 60°C: " 25,26,27,28

. 5 fioles par essai
. Incubation : 21 jours
. Extraction au chloroforme et pesée du résidu après évaporation du solvant.

4.3.3.2. Résultats.

Les résultats sont exposés au tableau 4.14 p.68
et représentés par les courbes de la figure 4.1 p.75

4.3.3.3. Analyse de variance.

Voir le tableau 4.15 ainsi que la figure 4.1 p.72

Tableau 4.14 : Influence de la température sur la biodégradation d'un pétrole brut.

T°C	Groupe		Perte totale (g)	Moyenne évaporation	Biodégradation (g)	Moyenne
4°C	1 Evap. PB	1	0.1572	0,1641	0	
		2	0.1621			
		3	0.1934			
		4	0.1555			
		5	0.1525			
	2 PB	1	0.2366		0.0725	0,0542
		2	0.2395		0.0754	
		3	0.2042		0.0401	
		4	0.1582		0.0059	
		5	0.2414		0.0773	
	3 Evap. F72	1	0.2799	0,2604	0	
		2	0.2313			
		3	0.2563			
		4	0.2709			
		5	0.2634			
	4 F72	1	0.2594		0.	0,0089
		2	0.2480		0.	
		3	0.2835		0.0231	
		4	0.2769		0.0165	
		5	0.2651		0.0047	
10°C	5 Evap. PB	1	0.1587	0,1505	0	
		2	0.1354			
		3	0.1286			
		4	0.1675			
		5	0.1672			
	6 PB	1	0.2303		0.0798	0.0564
		2	0.1906		0.0401	
		3	0.2143		0.0638	
		4	0.1839		0.0334	
		5	0.2153		0.0648	
	7 Evap. F72	1	0.2901	0.2765	0	
		2	0.2678			
		3	0.2672			
		4	0.2681			
		5	0.2894			
	8 F72	1	0.3458		0.0693	0,0639
		2	0.3344		0.0579	
		3	0.3488		0.0723	
		4	0.3346		0.0581	
		5	0.3382		0.0617	

Tableau 4. 14 : (suite)

T°C	Groupe		Perte totale (g)	Moyenne évaporation	Biodégradation(g)	Moyenne
20°C	9 Evap. PB	1	0,2399	0,2283	0	
		2	0,2125			
		3	0,2303			
		4	0,2518			
		5	0,2072			
	10 PB	1	0.2167		0	0.0178
		2	0.2712		0.0429	
		3	0.2410		0.0127	
		4	0.2506		0.0223	
		5	0.2395		0.0112	
	11 Evap. F72	1	0.2690	0.2680	0	
		2	0.2540			
		3	0.2795			
		4	0.2666			
		5	0.2707			
	12 F72	1	0.3098		0.0418	0.0756
		2	0.3395		0.0715	
		3	0.3666		0.0986	
		4	0.3356		0.0676	
		5	0.3666		0.0986	
30°C	13 Evap. PB	1	0.1686	0.1828	0	
		2	0.1927			
		3	0.1677			
		4	0.2032			
		5	0.1816			
	14 PB	1	0.1450		0	0.0030
		2	0.1980		0.0152	
		3	0.1722		0	
		4	0.1672		0	
		5	0.1746		0	
	15 Evap. F72	1	0.2780	0.2774	0	
		2	0.2460			
		3	0.2934			
		4	0.2615			
		5	0.3083			
	16 F72	1	0.3884		0.1110	0.1071
		2	0.4000		0.1226	
		3	0.3676		0.0902	
		4	0.4146		0.1272	
		5	0.3618		0.0844	

Tableau 4.14 (suite)

T°C	groupe		Perte totale (g)	Moyenne évaporation	Biodégradation(g)	Moyenne
40°C	17 Evap. PB	1	0.1352	0.1584	0	
		2	0.1893			
		3	0.1924			
		4	0.1501			
		5	0.1254			
	18 PB	1	0.2019		0.0434	0.0790
		2	0.2671		0.1086	
		3	0.2352		0.0767	
		4	0.2399		0.0814	
		5	0.2436		0.0851	
	19 Evap. F72	1	0.2095	0.2116	0	
		2	0.1854			
		3	0.1936			
		4	0.2518			
		5	0.2178			
	20 F72	1	0.3983		0.1867	0.1817
		2	0.3775		0.1659	
		3	0.3935		0.1819	
		4	0.3976		0.1860	
		5	0.3996		0.1880	
50°C	21 Evap. PB	1	0.2399	0,2232	0	
		2	0.2085			
		3	0.2187			
		4	0.2045			
		5	0.2445			
	22 PB	1	0.2636		0.0404	0.0347
		2	0.2723		0.0491	
		3	0.2542		0.0310	
		4	0.2629		0.0397	
		5	0.2365		0.0133	
	23 Evap.	1	0.2950	0,3175	0	
		2	0.3312			
		3	0.3054			
		4	0.3370			
		5	0.3190			
	24 F72	1	0.3650		0.0475	0.0420
		2	0.3392		0.0217	
		3	0.3644		0.0469	
		4	0.3545		0.0370	
		5	0.3744		0.0569	

Tableau 4.14 (suite)

T°C	groupe		Perte totale (g)	Moyenne évaporation	Biodégradation (g)	Moyenne
60°C	25 Evap. PB	1	0.2435	0.2531	0	
		2	0.2813			
		3	0.2426			
		4	0.2667			
		5	0.2313			
	26 PB	1	0.2967		0.0436	0.0388
		2	0.2626		0.0095	
		3	0.3190		0.0659	
		4	0.2878		0.0347	
		5	0.2936		0.0405	
	27 Evap. F72	1	0.3329	0.3422	0	
		2	0.3438			
		3	0.3568			
		4	0.3420			
		5	0.3353			
	28 F72	1	0.3882		0.0461	0.0315
		2	0.3777		0.0355	
		3	0.3611		0.0189	
		4	0.3576		0.0154	
		5	0.3838		0.0416	

poids initial (g) PB : 0,8510

PB + F 72 : 0,9410

Tableau 4 : 15

Influence de la température : analyse de variance

F 0,01=10,56 F 0,05= 5,12

	groupes		Somme des carrés	D.L.	Carrés moyens/test
Evaporation P.B.	1/5 (4°/10°)	Essai	46240	1	46240
		Erreur	231937	8	28992,12
		F=1,59			Non significatif
	5/9 (10°/20°)	Essai	1513210	1	1 513210
		Erreur	258641	8	32330,12
		F=46,80**			Hautement significatif
	9/13 (20°/30°)	Essai	517563	1	517563
		Erreur	233092	8	29136,5
		F=17,76**			Hautement significatif
	13/17 (30°/40°)	Essai	148840	1	148840
		Erreur	474757	8	59344,62
		F=2,50			Non significatif
	17/21 (40°/50°)	Essai	1049760	1	1049760
		Erreur	512092	8	64011,5
		F=16,40**			Hautement significatif
	21/25 (50°/60°)	Essai	223503	1	223503
		Erreur	297646	8	37205,75
		F=6,01			Significatif
Evaporation P.B + F72	3/7 (4°/10°)	Essai	64803	1	64803
		Erreur	194273	8	24340,37
		F=2,66			Non significatif
	7/11 (10°/20°)	Essai	18063	1	18063
		Erreur	92261	8	11532,62
		F=1,56			Non significatif
	11/15 (20°/30°)	Essai	22090	1	22090
		Erreur	278844	8	34855,5
		F=0,63			Non significatif
	15/19 (30°/40°)	Essai	1082410	1	1082410
		Erreur	511927	8	63990,87
		F=16,91**			Hautement significatif
	19/23 (40°/50°)	Essai	2803702,5	1	2803702,5
		Erreur	389218		48652,25
		F=57,63**			Hautement significatif
	23/27 (50°/60°)	Essai	152522,5	1	152522,5
		Erreur	157271	8	19658,9
		F=7,76**			Significatif

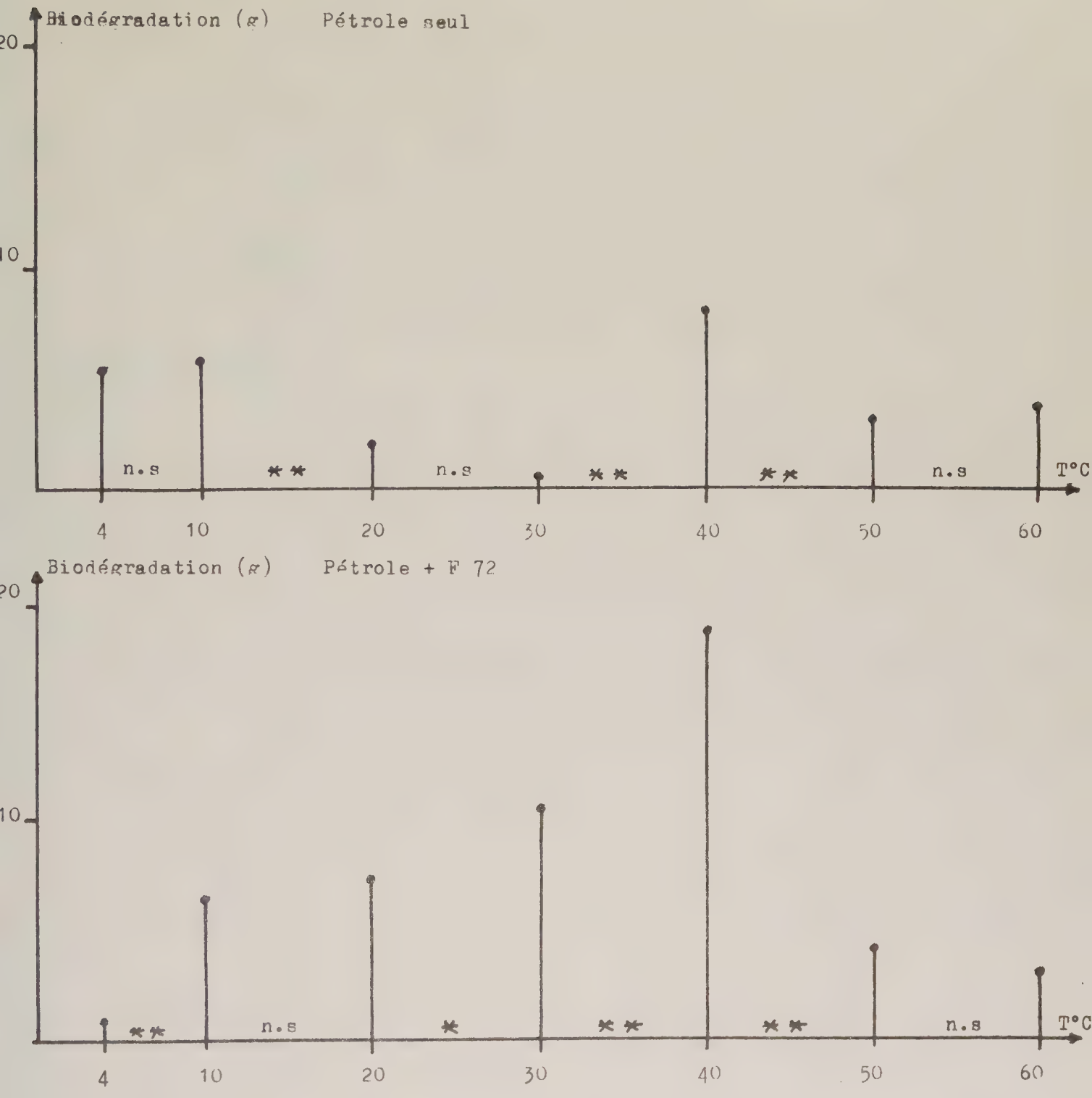
Tableau 4 : 15 (suite)

	groupes		Somme des carrés	D.L.	Carrés moyens/test
Biodégradation P B	2/6 (4°/10°)	Essai	1210	1	1210
		Erreur	531721	8	66465,12
		F=0,01			Non significatif
	6/10 (10°/20°)	Essai	372490	1	372490
		Erreur	250424	8	31303
		F=11,89**			Hautement significatif
	10/14 (20°/30°)	Essai	54464	1	54464
		Erreur	122151	8	15268,87
		F=3,56			Non significatif
	14/18 (30°/40°)	Essai	1442480	1	1442480
		Erreur	237662	8	29707,75
		F=48,55**			Hautement significatif
	18/22 (40°/50°)	Essai	490622,5	1	490622,5
		Erreur	292828	8	36603,5
		F=13,40**			Hautement significatif
	22/26 (50°/60°)	Essai	4202,5	1	4202,5
		Erreur	237214		29651,75
		F=0,14			Non significatif
Biodégradation PB + F72	4/8 (4°/10°)	Essai	756250	1	756250
		Erreur	60966	8	7620,75
		F=99,23**			Hautement significatif
	8/12 (10°/20°)	Essai	34223	1	34223
		Erreur	245545	8	30693,12
		F=1,11			Non significatif
	12/16 (20°/30°)	Essai	248063	1	248063
		Erreur	374162	8	46770,25
		F=5,30			Significatif
	16/20 (30°/40°)	Essai	1391290	1	1391290
		Erreur	179323	8	22415,37
		F=62,06**			Hautement significatif
	20/24 (40°/50°)	Essai	4879022,5	1	4879022,5
		Erreur	124155	8	15519,4
		F=314,38**			Hautement significatif
	24/28 (50°/60°)	Essai	27562,5	1	27562,5
		Erreur		8	20722,9
		F=1,33			Non significatif

Tableau 4 : 15 (suite)

	groupes		Somme des carrés	D.L.	Carrés moyens/test
	2/4 (4°)	Essai	513023	1	513023
		Erreur	428510	8	53563,75
		F=9,57*			Significatif
Biodégradation PB	6/8 (10°)	Essai	14063	1	14063
		Erreur	164177	8	20522,12
		F=0,68			Non significatif
/Biodégradation PB + F72	10/12 (20°)	Essai	835210	1	835210
		Erreur	331792	8	41474
		F=20,13**			Hautement significatif
	14/16 (30°)	Essai	2 707121	1	2 707121
		Erreur **	164521	8	20565,12
		F=131,63			Hautement significatif
	18/20 (40°)	Essai	2 636822	1	2 636822
		Erreur	252464	8	31558
		F=93,55**			Hautement significatif
	22/24 (50°)	Essai	13322,5	1	13322,5
		Erreur	164519	8	20564,9
		F=0,65			Non significatif
	26/28 (60°)	Essai	13322,5	1	13322,5
		Erreur	238478	8	29809,75
		F=0,45			Non significatif

Figure 4.1 : Biodégradation d'un pétrole brut en fonction de la température



Analyse de variance : ** Différence hautement significative
* Différence significative
n.s Différence non significative

On a employé une représentatiom ponctuelle des résultats, sans tracer de courbes. En effet, l'activité de biodégradation est fonction, non seulement de la température, mais aussi d'un paramètre non étudié: la composition de la microflore, variable avec la température. (On aurait pu tracer les courbes dans le cas d'une souche pure.)

4.3.3.4. Interprétation des résultats.

- L'évaporation du pétrole seul présente un maximum vers 20°C, décroît jusqu'à 40°C, puis s'accroît fortement de 40 à 60°C.
- L'évaporation du mélange pétrole + F72 reste constante de 4 à 30°C, présente un minimum à 40°C, et augmente fortement au-delà.
- La biodégradation du pétrole seul décroît entre 10 et 20°C, et présente un minimum entre 20 et 30°C. Elle s'accroît de façon hautement significative entre 30 et 40°C, pour diminuer ensuite rapidement.
- Avec F72, on constate une activité croissante de 4 à 40°C, valeur pour laquelle la biodégradation est maximum. Elle décroît très rapidement au-delà de 40°C.

Sauf à 4°C, les résultats de biodégradation sont augmentés de façon hautement significative par l'apport de F72.

4.3.3.5. Discussion des résultats et conclusions.

Il est important de noter que le phénomène de biodégradation se manifeste dans toute la gamme des températures testées.

Ceci confirme que la microflore adaptée aux hydrocarbures est composée de souches variées, les espèces se sélectionnant naturellement en fonction des conditions de culture (rappelons que les inoculums utilisés ont tous pour origine le même sol pollué). Ceci est vérifié sur les microphotos I et II qui montrent que les espèces dominantes sont différentes suivant la température considérée.

D'autre part, si l'on se réfère aux résultats de biodégradation, on constate que l'activité maximum, se situe entre 30 et 40°C (biodégradation avec F72 à 30°C : 0,1071g; à 40°C : 0,1817g, soit 1,8 fois plus).Ceci est caractéristique d'une microflore mésophile.

Notons cependant que, si l'on se réfère à la biodégradation sans additif, il semble y avoir une forte activité aux alentours de 10°C. Ceci indique la présence de microorganismes psychrophiles. La plupart des bactéries psychrophiles du sol sont des bat onnets gram-négatifs, en particulier des Pseudomonas et des Enterobacter (DOMMERGUES, 1970) dont on a vu que de nombreuses souches étaient impliquées dans le processus de biodégradation des hydrocarbures (cf. 2-3).

JOBSON et coll. (1972) ont noté qu'un pétrole brut est dégradé à 4°C par des souches de Pseudomonas et de Bacillus.

Par contre, on ne remarque pas la présence d'une microflore thermophile active, au moins avec l'inoculum que nous avons utilisé.

L'évaporation s'accroît de façon hautement significative au-délà de 40°C, ce qui est logique si l'on considère qu'une élévation de température favorise le départ d'un plus grand nombre de constituants.

Il est plus difficile d'expliquer le minimum d'évaporation constaté à 40°C. Nous pensons qu'il peut être dû aux conditions expérimentales (les étuves utilisées ne sont pas toutes de même modèle).

En outre la distillation d'un pétrole brut ne suit pas une relation linéaire, du fait de la répartition irrégulière des points d'ébullition des hydrocarbures constituants. En tout état de cause, ce point mériterait d'être vérifié, et nos méthodes sont certainement perfectibles.

Il n'en est pas moins vrai que les résultats de biodégradation obtenus sont fiables puisque l'on a tenu compte de l'évaporation dans tous les cas envisagés.

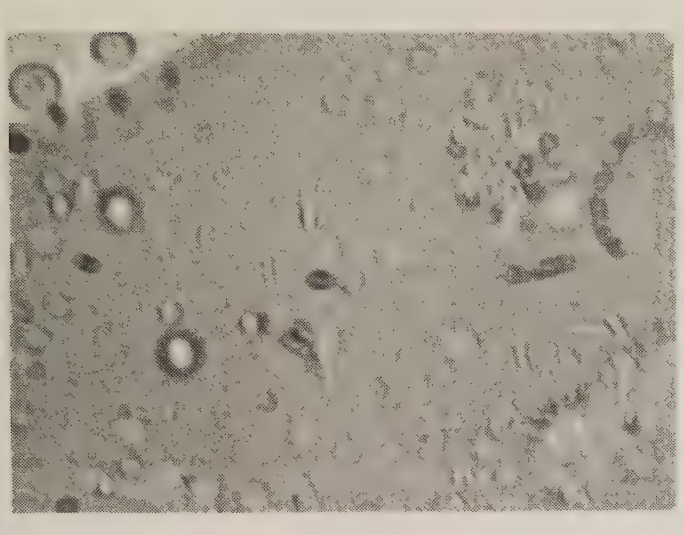
Microflores adaptées aux hydrocarbures.

Influence de la température et du pH

(milieu minéral + pétrole brut, incubation: I5 jours)

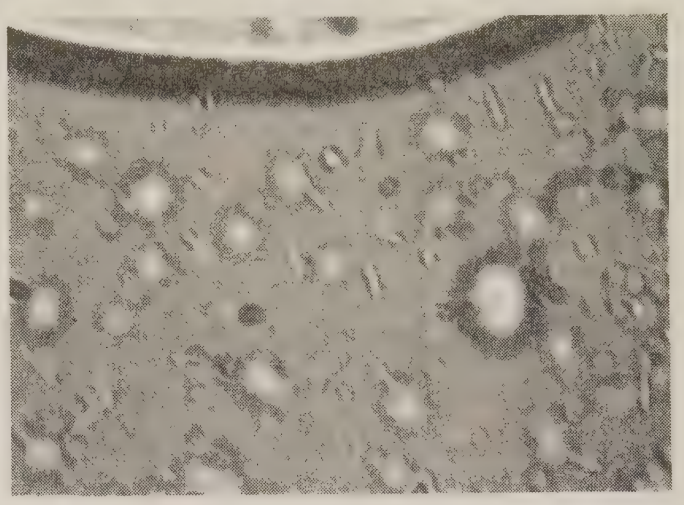
X : I750

I :30°C, pH 7

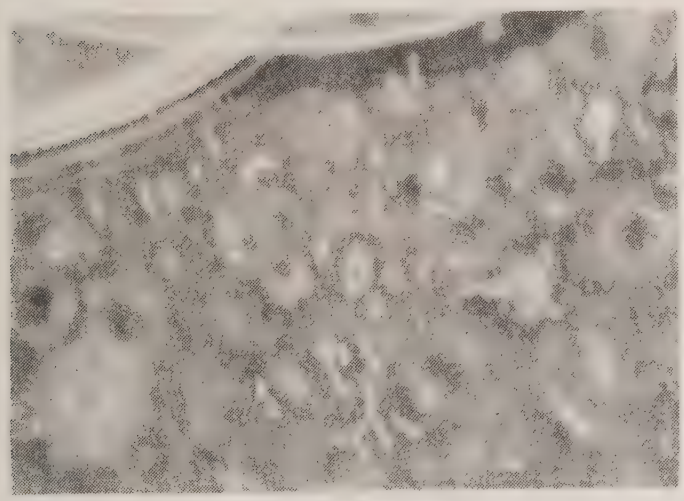


Bactéries+ formes filamenteuses (actinomycète)

II :I0°C, pH 7

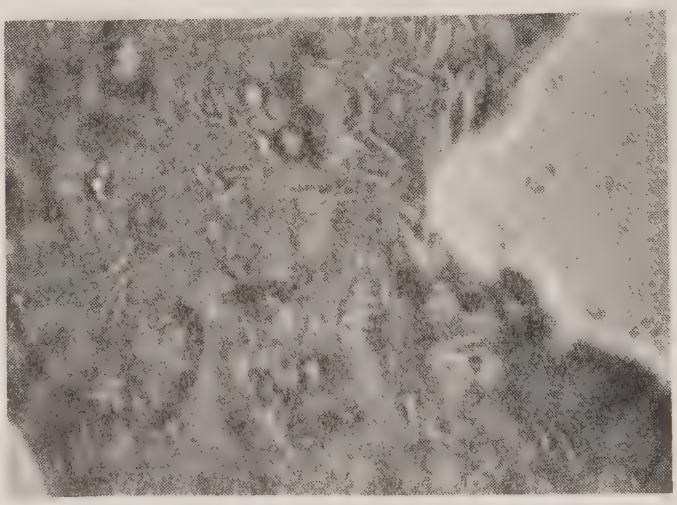


III :pH 4, 30°C



On note la présence de nombreuses levures.

IV :pH I0, 30°C



4.3.4. Influence du pH.

Des essais ont été réalisés aux pH : 4,6,8,10, ce qui couvre largement la gamme des pH en milieux naturels.

4.3.4.1. Protocole expérimental.

On a utilisé le milieu de KOUPENOV modifié sans azote. Le pH a été ajusté à l'aide de solutions normales de soude ou d'acide chlorhydrique, les inoculums ont été sélectionnés par précultures aux pH choisis. On a mesuré les pH en fin d'incubation.

- groupe A : fiole A_1 à A_5, témoins d'évaporation PB
  100 ml eau distillée + 1ml PB + NaN_3 10^{-2M}.
- groupe B : fioles B_1 à B_5, témoins d'évaporation PB+F72
  100 ml eau distillée + 1ml PB+0,1ml F72+NaN_3
- groupe C : fioles C_1 à C_5, biodégradation PB à pH_4
  (*)100 ml MKI + 1ml PB + inoculum
- groupe D : fioles D_1 à D_5, biodégradation PB à pH_6
  id(*), pH ajusté à 6
- groupe E : fioles E_1 à E_5, biodégradation PB à pH8
  id (*), pH ajusté à 8
- groupe F : fioles F_1 à F_5, biodégradation PB à pH 10
  id (*), pH ajusté à 10.
- Avec F72, les groupes de fioles aux pH 4,6,8 et 10 sont respectivement répertoriés G,H,I,J.

. Incubation 21 jours à 30°C

. Extraction au chloroforme et pesée du résidu après évaporation.

4.3.4.2. Résultats.

Ils sont exposés au tableau 4.16 et représentés par les graphiques de la figure 4.2. p.80 et 82.

4.3.4.3. Analyse de variance.

Voir le tableau 4.17 et la figure 4.2.

4.3.4.4. Interprétation des résultats.

- La biodégradation sans additif est maximum vers pH4 (0,1087 g). Elle reste sensiblement constante de pH6 à pH10, mais à un niveau nettement inférieur (0,0119 à 0,0260).
- Avec F72, il n'y a pas de différences significatives

entre les résultats obtenus aux différents pH; sauf à pH4, la biodégradation est environ 3 fois plus importante que sans additif (en moyenne 0,07g contre 0,015).

4.3.4.5. Discussion des résultats et conclusions.

La biodégradation se manifeste dans toute la gamme de pH essayés. Elle reste constante avec F72. La forte biodégradation mesurée à pH4 sans additif est peut-être dûe au fait que la composition de la microflore est sensiblement différente, comme on peut le constater sur les microphotos III et IV.

On note en particulier la présence de nombreuses levures et champignons filamenteux, ce qui est en accord avec les résultats trouvés dans la littérature (DAVIS, 1967).

En outre, le développement microbien se traduit par une modification du pH du milieu, malgré le tampon phosphate. (Voir tableau 4.18).

Le déséquilibre se produit très généralement dans le sens d'une acidification du milieu de culture (phénomène inverse pour pH initial =4). Ceci s'explique par le métabolisme des microorganismes adaptés aux hydrocarbures qui conduit à la production de divers produits, dont des acides gras (cf.2.1).

Tableau 4.18

Evolution du pH.

substrat	pH initial	pH en fin de culture(21 jours)
PB	4	4,2
PB	6	6
PB	8	7,4
PB	10	8
PB+F72	4	5,2
PB+F72	6	5,3
PB+F72	8	7,2
PB+F72	10	7,7

Tableau 4.16 - Influence du pH.

Groupe		Perte totale (g)	Biodégradation (g)	Biodégradation moyenne(g)
A Evaporation PB	1	0,2257	0	Evaporation moyenne 0,1971
	2	0,2110		
	3	0,1829		
	4	0,1868		
	5	0,1793		
B Evaporation PB + F72	1	0,2765	0	Evaporation moyenne 0,2880
	2	0,2917		
	3	0,3041		
	4	0,2748		
	5	0,2929		
C PB pH4	1	0,3003	0,1032	0,1087
	2	0,3156	0,1185	
	3	0,2872	0,0981	
	4	0,3254	0,1283	
	5	0,3007	0,1036	
D PB pH6	1	0,2152	0,0181	0,0119
	2	0,2285	0,0314	
	3	0,1722	0,	
	4	0,1820	0,	
	5	0,2070	0,0099	
E PB pH8	1	0,1781	0,	0,0144
	2	0,2187	0,0216	
	3	0,2184	0,0213	
	4	0,1887	0,	
	5	0,2261	0,0290	
F PB pH10	1	0,2210	0,0239	0,0260
	2	0,2032	0,0061	
	3	0,2496	0,0525	
	4	0,2115	0,0144	
	5	0,2304	0,0033	
G F72 pH4	1	0,3635	0,0755	0,0614
	2	0,3595	0,0715	
	3	0,3221	0,0341	
	4	0,3542	0,0662	
	5	0,3479	0,0599	
H F72 pH6	1	0,3610	0,0730	0,0736
	2	0,3718	0,0838	
	3	0,3734	0,0854	
	4	0,3591	0,0711	
	5	0,3429	0,0549	
I F72 pH8	1	0,3592	0,0712	0,0658
	2	0,3554	0,0674	
	3	0,3516	0,0636	
	4	0,3633	0,0753	
	5	0,3394	0,0514	
J F72 pH10	1	0,3556	0,0676	0,0745
	2	0,3600	0,0720	
	3	0,3856	0,0976	
	4	0,3563	0,0683	
	5	0,3550	0,0670	

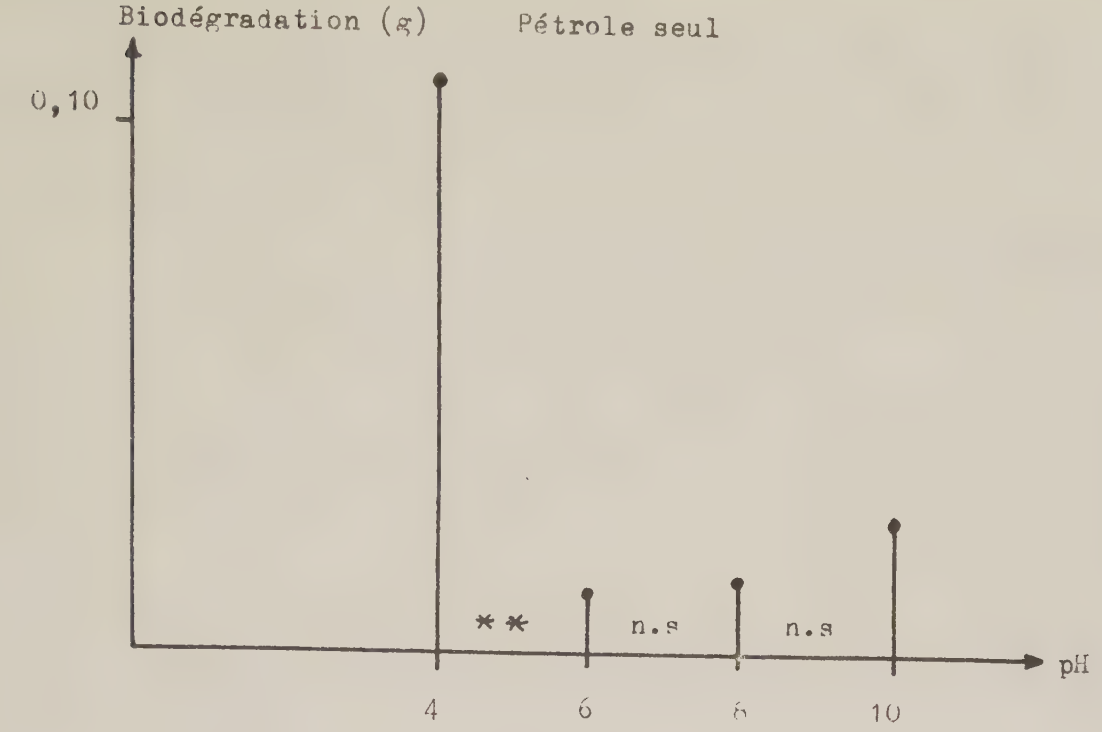
Tableau 4.17

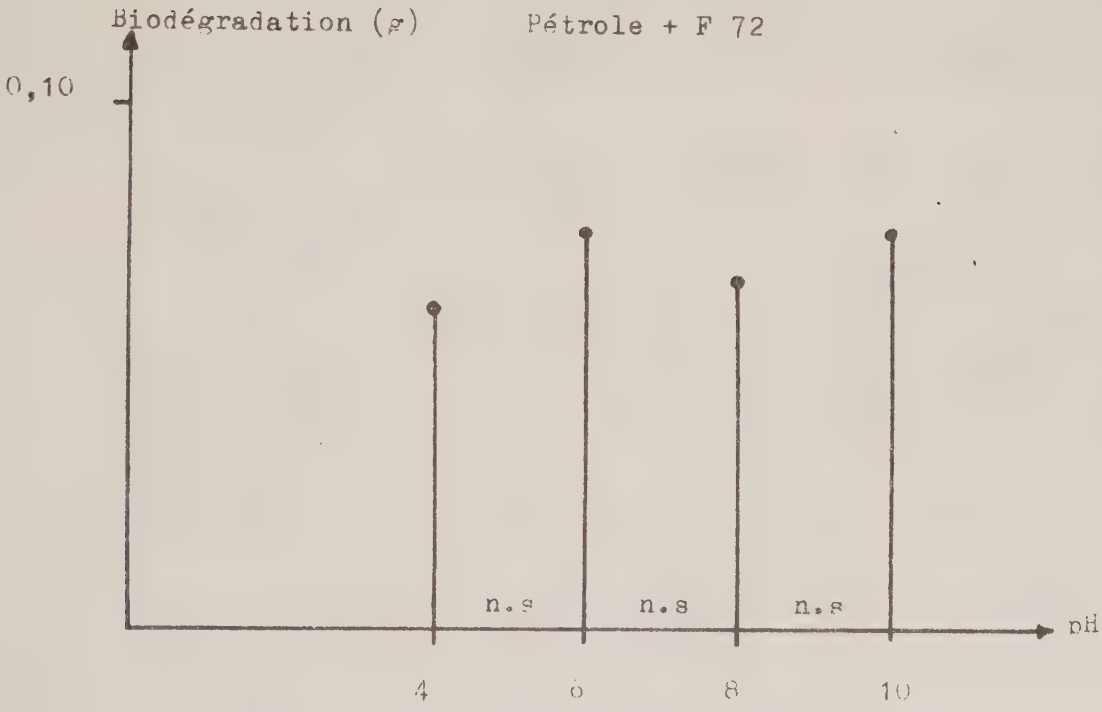
Influence du pH : Analyse de variance

F 0,01 = 11,26 F 0,05= 5,32

	Groupes		Somme des carrés	D.L	Carrés moyens/test
Biodégradation PB	C/D (pH4/pH6)	Essai Erreur F=195,39 **	2 342,560 95915	1 8	2 342 560 11 989 Hautement significatif
	D/E (6/8)	Essai Erreur F=0,17	1562,5 73470	1 8	1562,5 9183,75 Non significatif
	E/F (8/10)	Essai Erreur F=1,08	33640 160253	1 8	33640 20032 Non significatif
Biodégradation PB + F72	G/H (4/6)	Essai Erreur F=1,78	37210 167098	1 8	37210 20887,25 Non significatif
	H/I (6/8)	Essai Erreur F=1,30	15210 93375	1 8	15210 11671,9 Non significatif
	I/J (8/10)	Essai Erreur F=1,49	18922,5 101633	1 8	18922,5 12704,13 Non significatif
Biodégradation PB	C/G (pH4)	Essai Erreur F=23,83 **	559322,5 160786	1 8	559322,5 20098,25 Hautement significatif
/Biodégradation PB +F72	D/H (pH6)	Essai Erreur F=74,48 **	951722,5 102 227	1 8	951722,5 12778,38 Hautement significatif
	E/I (pH8)	Essai Erreur F=81,77 **	660490 64618	1 8	660490 8077,25 Hautement significatif
	F/J (pH10)	Essai Erreur F=23,85 **	588062,5 197268	1 8	588064,5 24658,5 Hautement significatif

Figure 4.2 : Biodégradation d'un pétrole brut en fonction du pH (Représentation ponctuelle)





Analyse de variance : ** Différence hautement significative
n.s Différence non significative

4.4. CONSIDERATIONS SUR LE TAUX DE BIODEGRADATION.

On a signalé (3.1.3.) que, dans nos conditions expérimentales, on observait un net ralentissement du phénomène de biodégradation au-delà de 21 jours. Nous avons émis l'hypothèse suivante :

La biodégradation d'un pétrole brut en milieu fermé a comme principal facteur limitant l'accumulation de produits du métabolisme bactérien.

Nous avons choisi, comme première approche, de remettre à incuber, dans du milieu renouvelé, le résidu d'une biodégradation précédente.

D'autre part, on a voulu essayer de déterminer, au moins qualitativement, la nature des fractions pétrolières dégradées après une culture de 21 jours à 30°C. Dans ce but, on a réalisé une analyse chromatographique des résidus de biodégradation.

4.4.1. Limite de biodégradation d'un pétrole brut.

On a récupéré le résidu d'une biodégradation expérimentale après évaporation complète du chloroforme ayant servi à l'extraction.

On a remis à incuber, dans les mêmes conditions expérimentales, ce résidu en renouvelant le milieu et l'inoculum.

4.4.1.1. Protocole expérimental.

Etant donné la consistance du résidu, nous n'avons pas cherché à peser des quantités rigoureusement identiques. Nous avons tenté de ne faire que trois répétitions par essai.

groupe A: Biodégradation naturelle.

A_1: 100 ml MKC + 0,3579 g résidu + inoculum Chênaie
A_2: " " + 0,3600 g " + " "
A : " " + 0,3597 g " + " "

groupe B : Biodégradation avec F72

B_1: 100 ml MKC + 0,3813 g de résidu + 0,18g F72 + inoculum
B_2: " " + 0,3431 g " + " + "
B_3: " " + 0,3591 g " + " + "

- Incubation 21 jours à 30°C.
- Extraction du résidu et pesée après évaporation du chloroforme.

4.4.1.2. Résultats

Tableau 4.19

Groupe		Perte totale (g)	Biodégradation (g)	Moyenne (g)
A résidu	1	0,0494	0,0005	0,0010
	2	0,0513	0,0024	
	3	0,0407		
B + F72	1	0,2307	0,0480	0,0436
	2	0,2245	0,0398	
	3	0,2277	0,0430	

Evaporation moyenne (g) résidu seul : 0,0489
résidu + F 72 : 0,1847

4.4.1.3. Analyse de variance

	Somme des carrés	D.L.	Carrés moyens
Essai	136 107	1	136 107
Erreur	3737	4	934,25

F= 145,69** (F0,01= 21,20) Différence hautement significative

4.4.1.4. Interprétation et discussion.

La biodégradation naturelle du résidu est très faible (0,0010g). Avec F72, elle est hautement significative (0,0436). Ceci tend à montrer que le palier observé au bout de 21 jours est bien dû à des facteurs limitants s'accumulant en milieu fermé et qu'il ne correspond pas à une limite de la biodégradation.

Cependant, ainsi que l'indique la faible biodégradation naturelle, le processus se ralentit. Nous pensons que ceci s'explique par le fait que les fractions rapidement dégradables ont été assimilées au cours de la biodégradation initiale. Le résidu est donc composé de fractions pétrolières complexes (hydrocarbures ramifiés, naphténiques et asphaltiques), dont l'attaque est plus lente (cf.2.1.2.).

Nous avons vérifié qualitativement ce fait par l'analyse chromatographique.

4.4.2. Analyses chromatographiques.

Des analyses par chromatographie en phase gazeuse des résidus pétroliers permettent d'apporter quelques précisions quant au mécanisme de la biodégradation.

4.4.2.1. : Chromatogrammes

Figure 4.1. : chromatogramme du pétrole brut de Kuweit avant évaporation et biodégradation.

Figure 4.2. : chromatogramme du PB après évaporation, sans biodégradation.

Figure 4.3. : chromatogramme du résidu pétrolier après biodégradation en milieu MKC sans additif F72 (21 jours à 30°C).

Figure 4.4. : id. avec F 72 .

4.4.2.2. Conditionsd'injection.

- 5 µl de solution échantillon-chloroforme.
- Température détecteur 310°C
- Température injecteur 290°C
- sensibilité x 256
- Programmation de température : 130°-280°C, élévation 5°C/mn.

4.4.2.3. Lecture des chromatogrammes(*).

- Les grands pics représentent les n-paraffines.
- Les pics intermédiaires représentent les isoparaffines et les composés éthyléniques.
- Les autres composants ne sont pas séparés (espace compris entre la ligne 0 et la ligne de base).

4.4.2.4. Interprétation et discussion.

- La comparaison des figures 1 et 2 montre que l'évaporation du pétrole brut se traduit en particulier par la perte des n- et iso-paraffine jusqu'à C_{12}. Ceci explique des résultats d'évaporation de l'ordre de 30% du poids initial de PB, après 21 jours(**).

(*) - Les chromatographies réalisées ne permettent d'identifier les paraffines que jusqu'au niveau C_{30} (280°C). Un pétrole brut renferme des constituants pouvant atteindre C_{50}.

(**)- 30% en tenant compte du départ des hydrocarbures aromatiques volatils , non visibles sur les chromatogrammes.

- La figure 3 montre que la biodégradation naturelle du pétrole brut affecte pratiquement la totalité des paraffines (n-et iso-). Seuls subsistent les pics correspondant au pristane (iso-C_{17}).et phytane (iso-C_{18}).
- La figure 4 présente une allure très voisine de la figure 3. Or nous avons vu que le F72 favorise la biodégradation. Il est probable que son action porte peu sur les paraffines (naturellement biodégradables), mais qu'elle se situe au niveau d'autres constituants du pétrole.

Figure 4.1 P.B avant évaporation

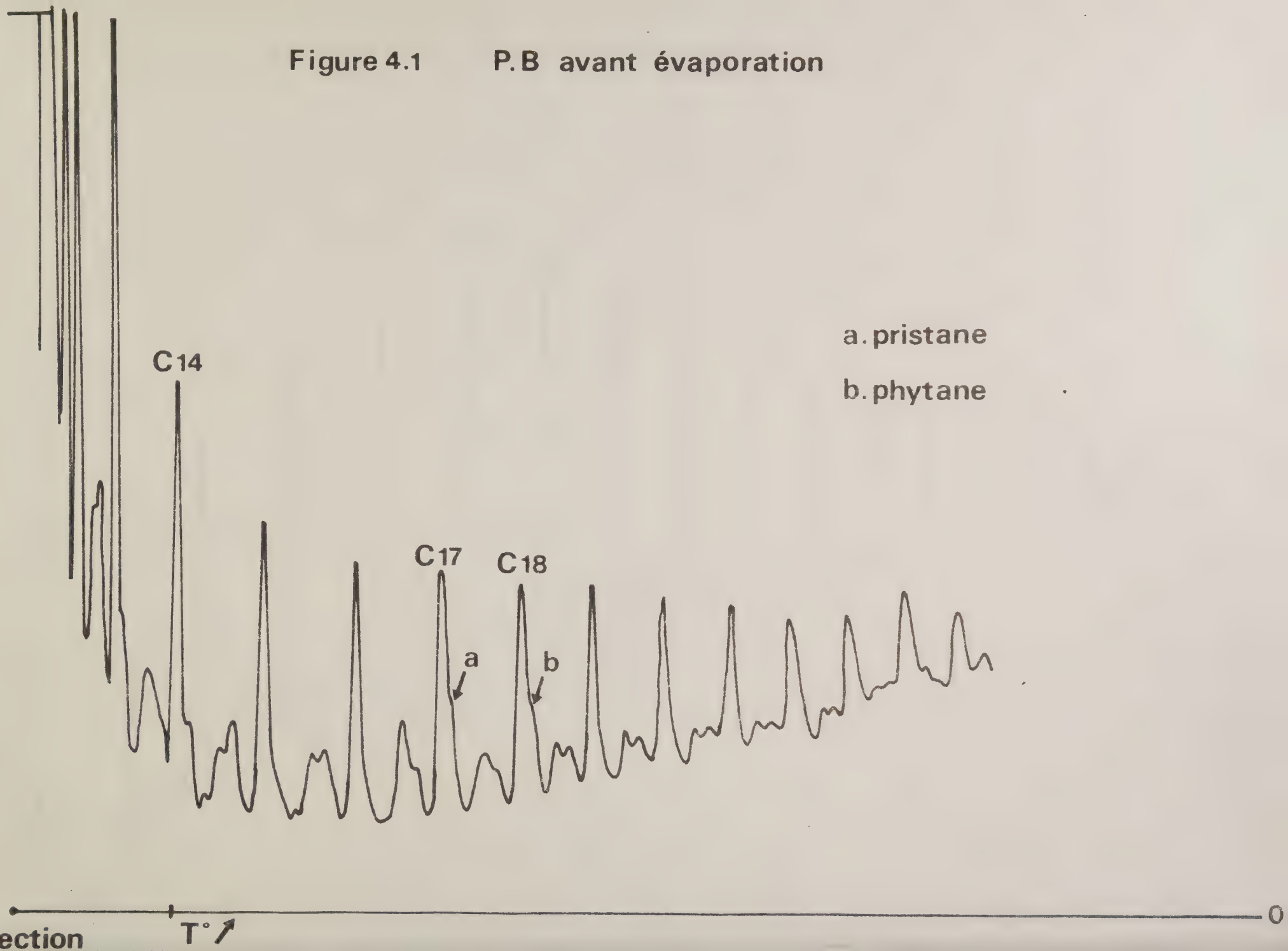


Figure 4.2 P.B après évaporation

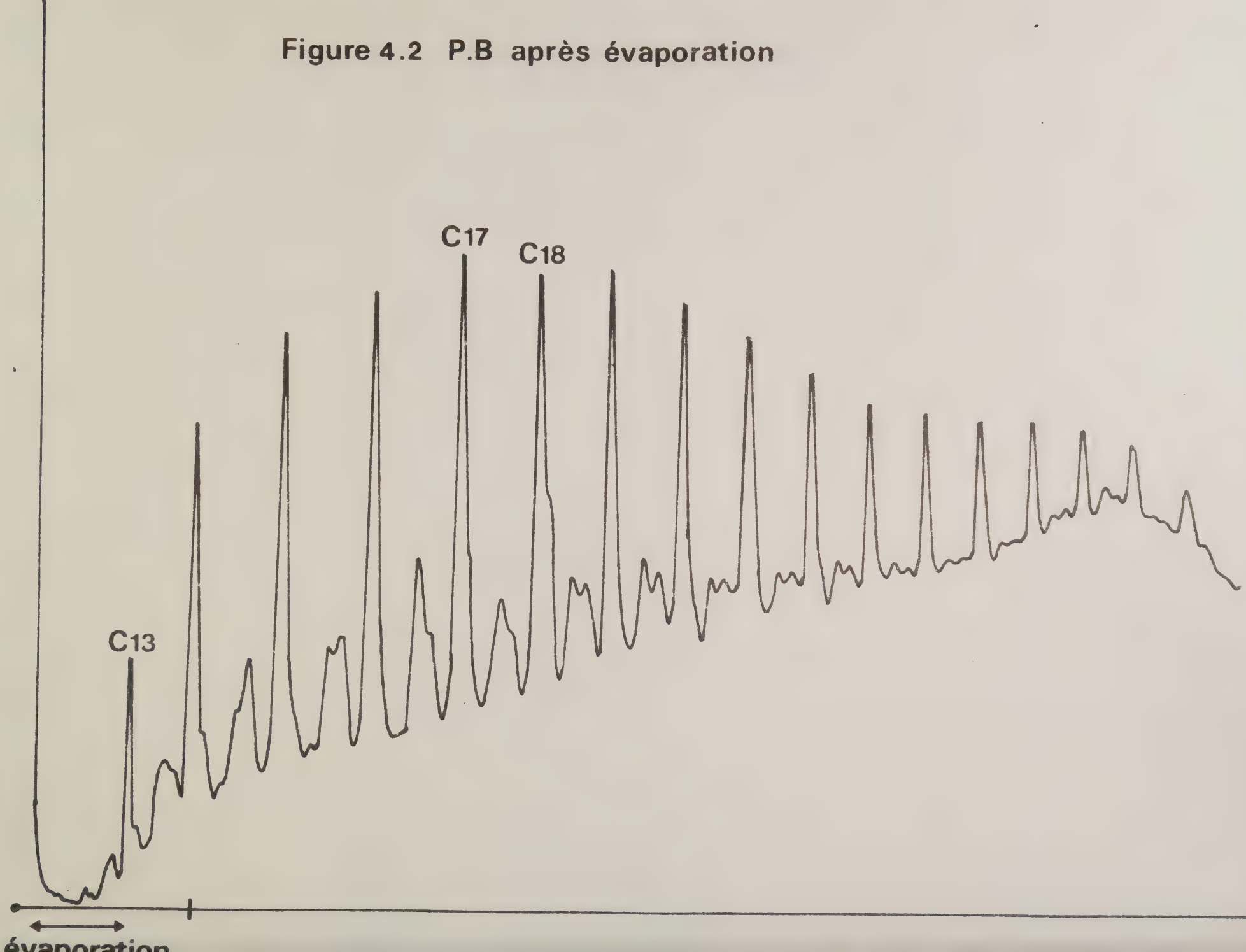


Figure 4.3 P.B après biodégradation

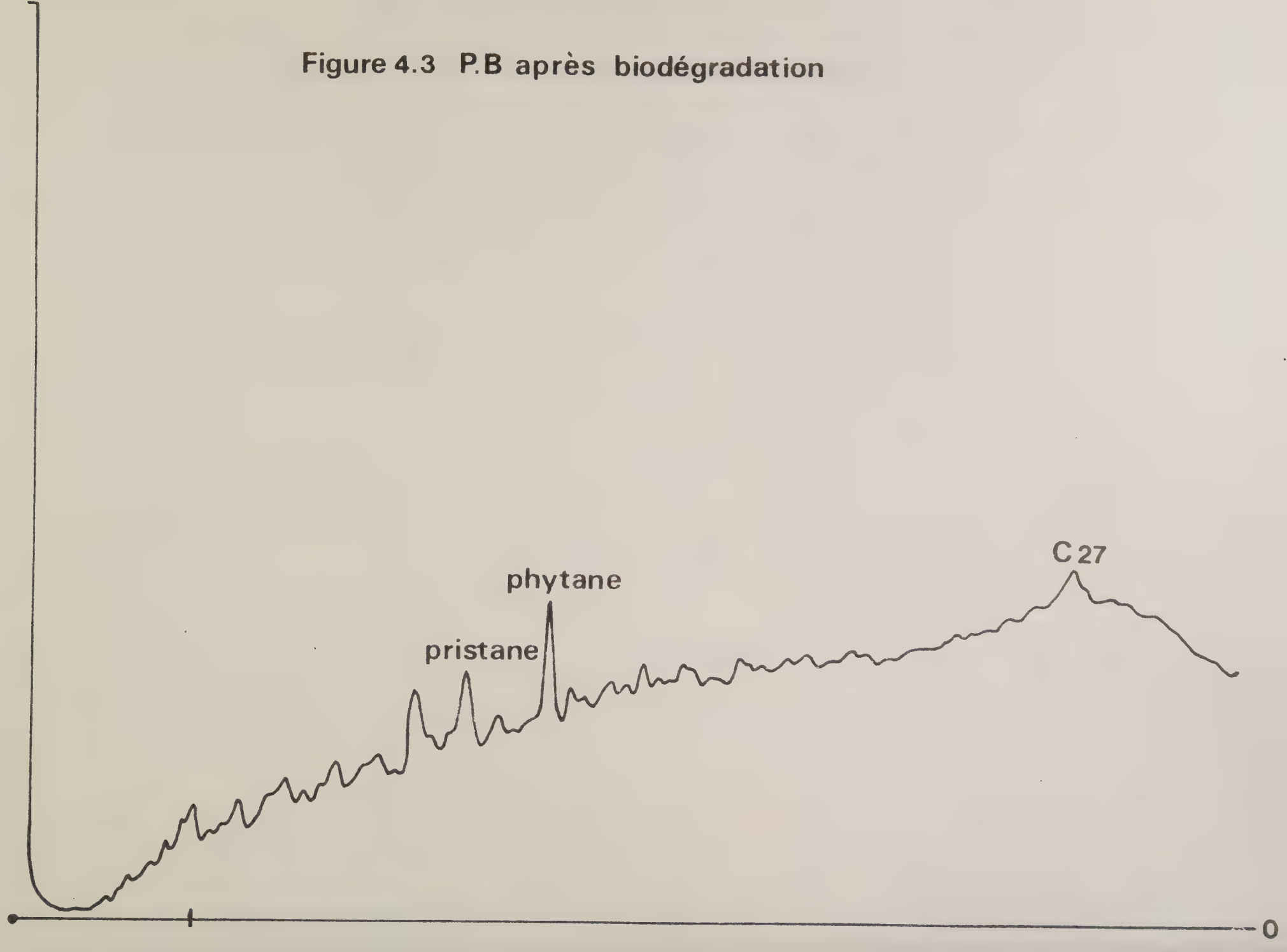
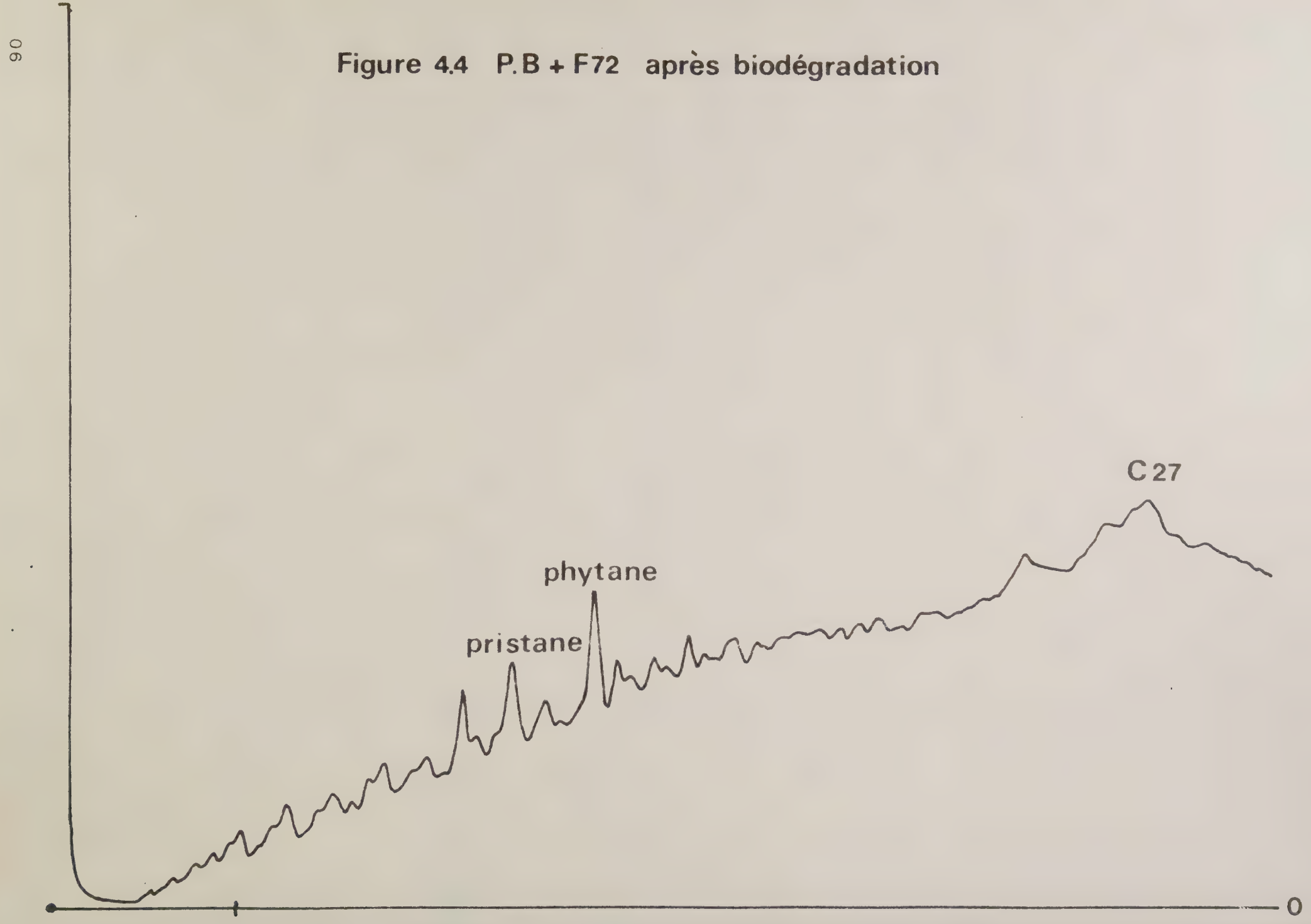


Figure 4.4 P.B + F72 après biodégradation



5. EXPERIMENTATION SUR LE SOL

Parallèlement aux essais de laboratoire, on a mené plusieurs expérimentations sur des sols de nature et d'origine diverses, de façon à apporter des éléments complémentaires concernant la dégradation bactérianne des hydrocarbures.

Dans ces expériences, nos observations ont porté sur l'évolution globale du phénomène. Sans être en mesure de définir tous les paramètres, nous avons pu réunir des informations en nous basant sur les indications fournies par la comparaison de la microflore totale et de la microflore adaptée aux hydrocarbures dans un sol pollué par rapport à un sol témoin non pollué.

D'autre part, nous avons étudié certains aspects de l'action d'un épandage d'hydrocarbures sur la flore phanérogamique d'un sol.

5.1. EVOLUTION DE LA MICROFLORE DANS UN SOL POLLUE PAR DES HYDROCARBURES.

Un épandage d'hydrocarbures dans un milieu naturel se traduit par une modification de la microflore présente dans ce milieu.

On note, en particulier, un développement des souches adaptées à la biodégradation des produits pétroliers.

Il est donc intéressant de suivre l'évolution de la microflore adaptée, par rapport à la microflore totale, dans un sol pollué et dans un sol témoin.

La technique générale utilisée consiste à effectuer des dénombrements de microflore totale et de microflore adaptée par numération indirecte en milieu liquide (cf.2.2.1.).

On a suivi l'évolution de la microflore de trois sols pollués : Auvers-sur-Oise, la Courneuve, la Mailleraye.

5.1.1. Auvers-sur-Oise.

5.1.1.1. Généralités

On a volontairement pollué, par divers hydrocarbures, une terre de jardin.

. Répartition des parcelles.

0	1	2	3	0	4	5	6	0

0 : Témoin non pollué
1 : Pétrole brut + F72
2 : Fuel n°2 + F72
3 : Huile de vidange + F72
4 : Pétrole brut + S320
5 : Fuel n°2 + S320
6 : Huile de vidange + S320

L'analyse a été réalisée un mois après la pollution.

5.1.1.2. Protocole expérimental

On procède à l'ensemencement, avec des suspensions-dilutions de sol, d'un milieu liquide pour rechercher la dilution limite donnant lieu à une culture (cf.2.2.1).

- La microflore totale (M.T.) est évaluée par culture en bouillon nutritif.
- La microflore adaptée (M.A) par culture en milieu de KOUPENOV modifié complet (MKC) contenant du pétrole brut comme source de carbone et d'énergie.
- Incubation à 30°C : MT : 5 jours; MA: 15 jours

5.1.1.3. Résultats.

Tableau 5.1.

Microflores totales et microflores adaptées d'Auvers-sur-Oise.

Echantillon		Nombre probable de bactéries /g. de terre	$\frac{MA}{MT}$ (%)
0	MT	$9.5.10^5$	4,7%
	MA	$4.5.10^4$	
1	MT	$9.5.10^6$	16%
	MA	15.10^5	
2	MT	$4.5.10^7$	21%
	MA	$9.5.10^6$	
3	MT	$9.5.10^6$	16%
	MA	$15.\ 10^5$	
4	MT	$2.5.10^6$	38%
	MA	$9.5.10^5$	
5	MT	$4.5.10^6$	33%
	MA	$15.\ 10^5$	
6	MT	$2.5.10^6$	30%
	MA	$7.5.10^5$	

5.1.1.4. Interprétation.

- Toutes les parcelles traitées contiennent plus de bactéries que les témoins (environ 10X).
- Le pourcentage de flore adaptée aux hydrocarbures/flore totale est plus élevé dans toutes les parcelles traitées (de 16 à 38% contre 5% dans les témoins).
- Le pourcentage de flore adaptée/flore totale est plus élevée dans les parcelles traitées au S320 (38,33,30%) que dans celles traitées au F72 (16,21,16%).
- Le pourcentage de flore adaptée est sensiblement le même quelque soit le substrat hydrocarbure (PB, fuel, huile de vidange).

5.1.2. La Courneuve.

5.1.2.1. Généralités

En Novembre 1973, on a épandu, sur des terrains du Dépôt des essences des Armées de la Courneuve, 7 m^3 de résidus d'hydrocarbures provenant d'une cuve en terre, après mélange avec du S320 (cf.2.3.1.1.). Les parois de la cuve ont été traitées au F72. L'épandage sur le sol a été réalisé sur 3 parcelles avec diverses proportions d'eau, soit diverses concentrations de mélange sur le sol.

- Parcelle 1 : 50% mélange - 50% eau (en volume)
- Parcelle 2 : 50% mélange - 75% eau
- Parcelle 3 : 50% mélange - 100% eau
- Parcelle 4 : sol témoin non pollué
- Echantillons : paroi de la cuve

On a réalisé deux analyses : deux mois et 5 mois après l'épandage.

5.1.2.2. Protocole expérimental.

Identique à 5.1.1.2.

5.1.2.3. Résultats

Voir tableau 5.2, p. 95

5.1.2.4. Interprétation

- La population bactérienne totale est plus élevée dans les parcelles polluées et traitées que dans la parcelle témoin (de 10x à 100x).
- Le pourcentage microflore adaptée/microflore totale est plus élevé dans les parcelles polluées (de 10x à 200x).
- Si l'on compare les résultats des deux analyses, on constate que la microflore totale est du même ordre de grandeur dans les deux cas. Par contre, la microflore adaptée est plus faible dans la seconde analyse (environ 10x).

On peut émettre l'hypothèse suivante :

. 1ère analyse :MA/MT est élevé. L'activité microbienne est intense, laissant supposer un taux de biodégradation élevé.

Tableau 5.2.

Microflores totales et microflores adaptées de la Courneuve.

Echantillon		2 mois : Nombre de bactéries/g	2 mois : MA/MT	5 mois : Nombre de bactéries/g.	5 mois : MA/MT
1 50-50	MT	$9,5.10^{9}$	1,6%	$9,5.10^{8}$	0,16%
	MA	15.10^{7}		15.10^{5}	
2 75-50	MT	$9,5.10^{8}$	2,1%	$9,5.10^{7}$	1%
	MA	20.10^{6}		$9,5.10^{5}$	
3 100-50	MT			$4,5.10^{8}$	0,21%
	MA			$9,5.10^{5}$	
4 Témoin	MT	$11,5.10^{6}$	0,2%	$2,5.10^{7}$	0,004%
	MA	20.10^{3}		$9,5.10^{2}$	
5 Paroi cuve	MT	$9,5.10^{8}$	4,7%	$4,5.10^{8}$	0,44%
	MA	$4,5.10^{7}$		20.10^{5}	

- 2ème analyse : MA/MT est inférieur. L'activité biodégradante a diminué, et concerne vraisemblablement les composés de poids moléculaire élevé, plus lents à dégrader (cf. 2.1.2. et 4.4.2).

Cependant, le processus de biodégradation n'est certainement pas achevé, le rapport MA/MT étant encore supérieur à celui du sol témoin.

5.1.3. La Mailleraye

5.1.3.1. Généralités.

Cette étude porte sur des échantillons provenant de la raffinerie de la Mailleraye (ESSO Standard). Le problème posé était l'élimination par voie biologique de résidus d'hydrocarbures divers.

Ces résidus ont été épandus sur le terrain de la raffinerie et mélangés à la couche superficielle du sol(*), puis traités avec des engrais phosphorés (100 g/m^2).

On a délimité quatre parcelles ayant subi des traitements différents :

- Parcelle 1: traitement à l'engrais phosphoré + F72
- Parcelle 2: " " " + S320
- Parcelle 3: " " " seul(Témoin 1)
- Parcelle 4: " " " seul(Témoin 2)

On a suivi l'évolution de la microflore bactérienne en réalisant quatre séries d'analyses aux temps to (traitement), to + 19j; to + 38j et to + 76j.

5.1.3.2. Protocole expérimental.

Il est identique à celui décrit à 5.1.1.2.

5.1.3.3. Résultats.

Voir les tableaux 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, ainsi que les figures 5.1, 5.2, 5.3, 5.4.

(*)- Les terres prélevées dans l'enceinte de la raffinerie contenaient un mélange d'huiles minérales et d'additifs organiques (sulfonates, phénols) dans une proportion variant de 5 à 30% du poids.

Tableau 5.3.

Parcelle		ANALYSE I (t) Nb germes/g de terre	MA/MT
1	MT	$2,5 . 10^7$	0,8%
	MA	$20 . 10^4$	
2	MT	$9,5 . 10^6$	2,6%
	MA	$2,5 . 10^5$	
3	MT	$4,5 . 10^8$	0,33%
	MA	$15 . 10^5$	

Tableau 5.4

Parcelle		ANALYSE II (t+19) Nb germes/g de terre	MA/MT
1	MT	$2,5 . 10^7$	1%
	MA	$25 . 10^4$	
2	MT	$9,5 . 10^8$	10%
	MA	$9,5 . 10^7$	
3	MT	$9,5 . 10^7$	4,7%
	MA	$4,5 . 10^6$	
4	MT	$2,5 . 10^7$	3,8%
	MA	$9,5 . 10^5$	

Tableau 5.5.

Parcelle		ANALYSE III (t + 39) Nb germes/g de terre	MA/MT
1	MT	$2,5 \cdot 10^{8}$	0,06%
	MA	$4,5 \cdot 10^{5}$	
2	MT	$9,5 \cdot 10^{10}$	0,08%
	MA	$15 \cdot 10^{7}$	
3	MT	$4,5 \cdot 10^{9}$	0,18%
	MA	$2,5 \cdot 10^{6}$	
4	MT	$2,5 \cdot 10^{8}$	0,001%
		$2,5 \cdot 10^{3}$	

Tableau 5.6.

Parcelle		ANALYSE IV (t + 76) Nb germes/g de terre	MA/MT
1	MT	$9,5 \cdot 10^{8}$	0,16%
	MA	$15 \cdot 10^{5}$	
2	MT	$4 \cdot 10^{9}$	7,5 %
	MA	$30 \cdot 10^{7}$	
3	MT	$15 \cdot 10^{7}$	6%
	MA	$9,5 \cdot 10^{6}$	
4	MT	$2,5 \cdot 10^{8}$	10 %
	MA	$2,5 \cdot 10^{7}$	

Figure 5.I: Représentation graphique de l'évolution de la microflore du sol de la Mailleraye

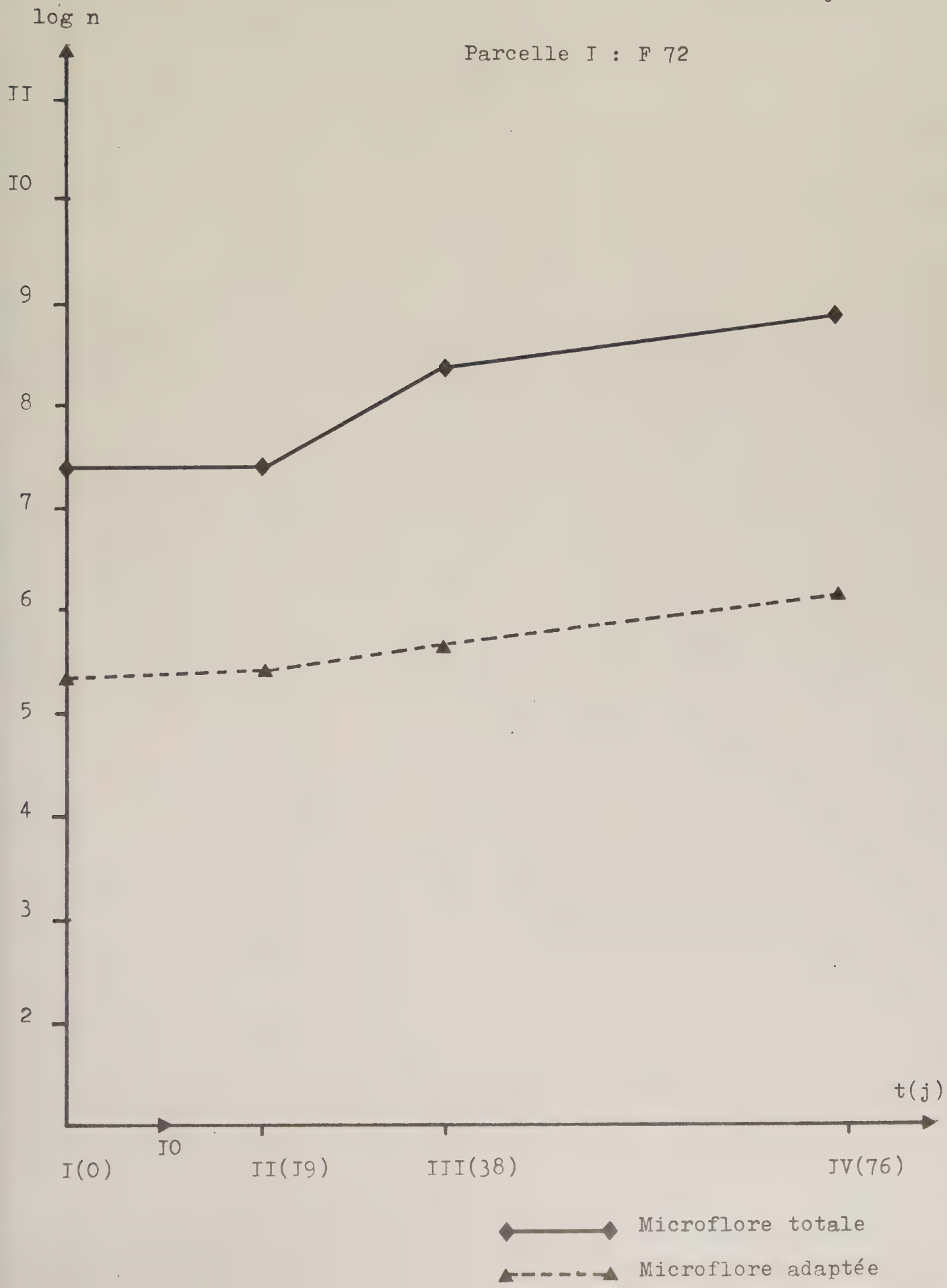


Figure 5.2: Représentation graphique de l'évolution de la microflore du sol de la Mailleraye

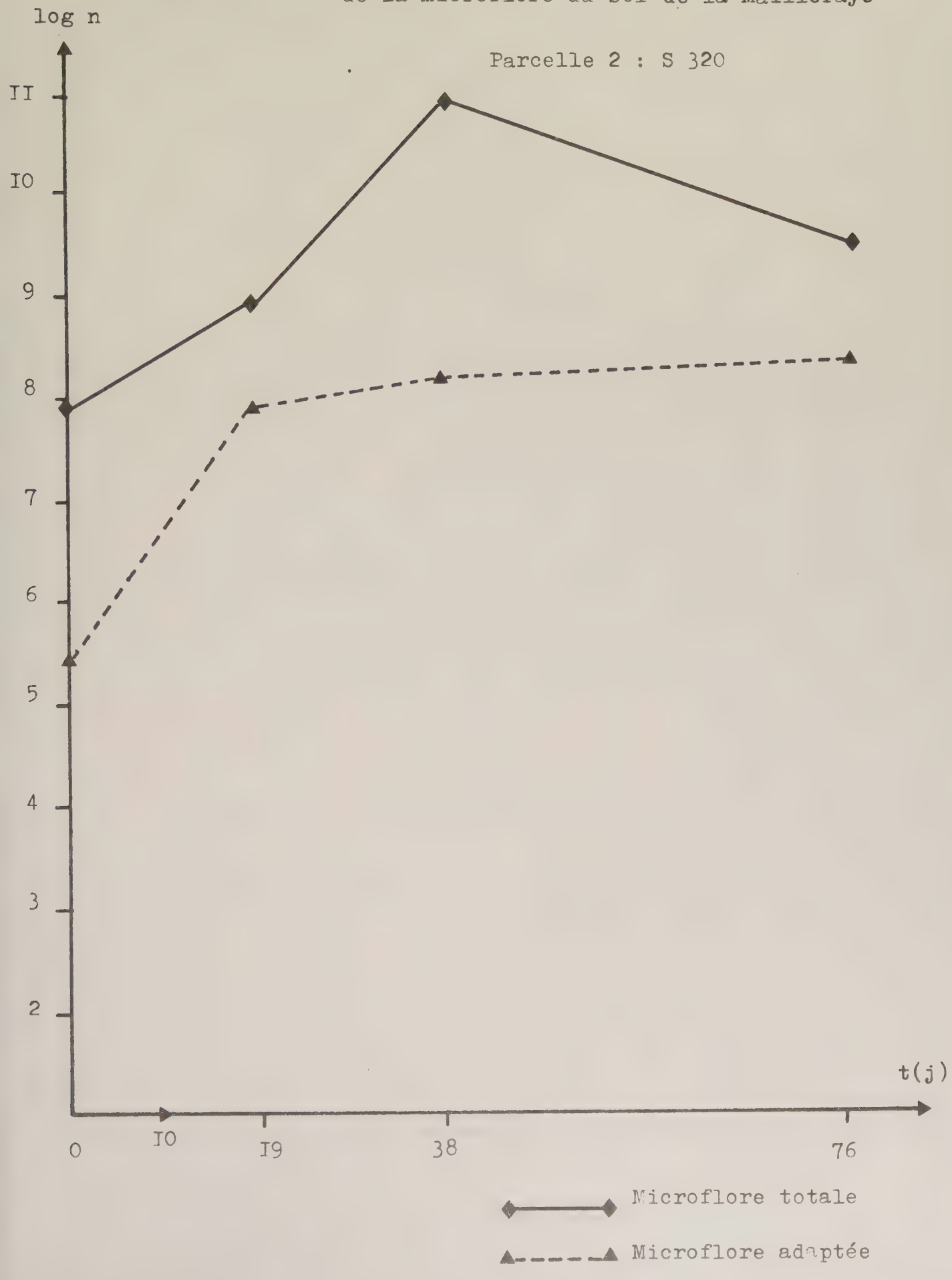


Figure 5.3: Représentation graphique de l'évolution de la microflore du sol de la Mailleraye

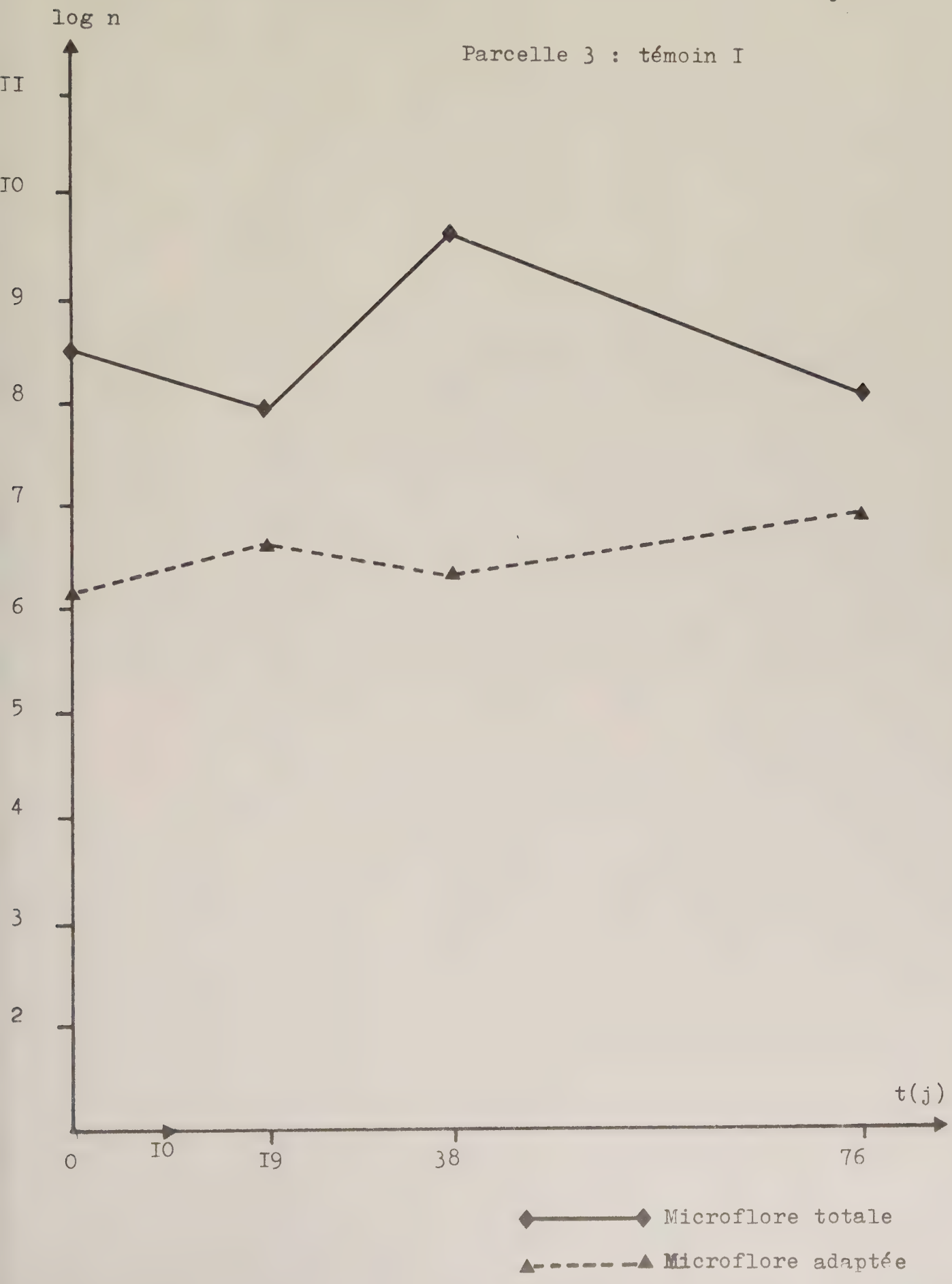
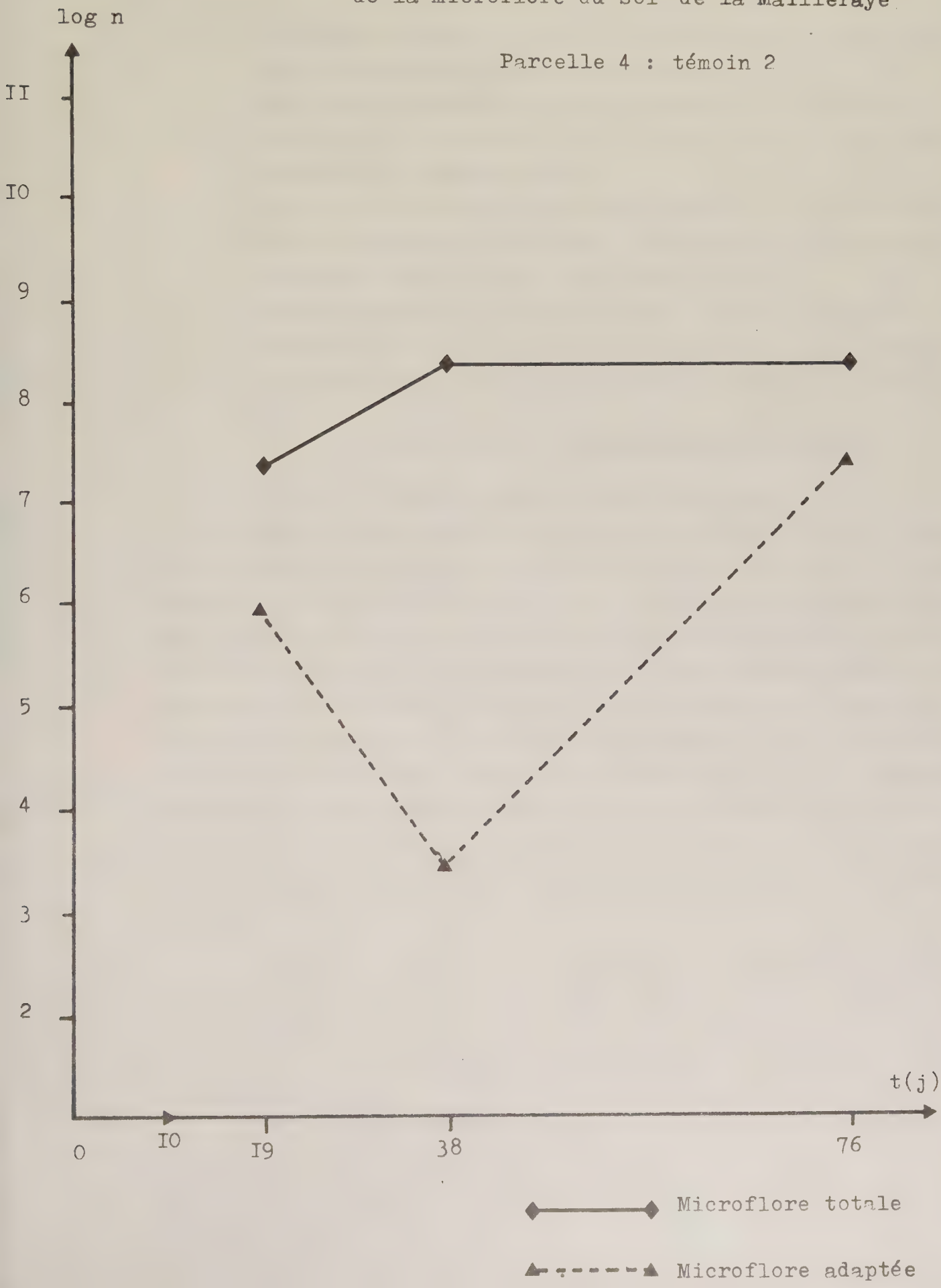


Figure 5.4: Représentation graphique de l'évolution de la microflore du sol de la Mailleraye



5.2.3.4. Interprétation.

- Dans tous les cas, on note la présence d'une microflore active vis-à-vis des hydrocarbures.
- Sauf dans la parcelle traitée au S320, la microflore totale varie entre 10^7 et 10^9 bactéries/g de terre, et reste relativement stable.
  La microflore adaptée aux hydrocarbures varie entre 10^5 et 10^7 bactéries/g de terre, cette population restant également assez stable (sauf parcelle 4).
- Dans la parcelle traitée au S320, on note une très nette augmentation de la microflore totale (10^9 à 10^{10} bactéries /g de terre), et de la microflore adaptée (10^8 à 10^9).

5.1.4. Discussion des résultats et conclusions.

On peut faire les observations suivantes :
Un épandage d'hydrocarbures sur le sol se traduit par une modification sensible de la population bactérienne. On note un accroissement de la microflore totale (de 10 à 1000 x par rapport à un sol témoin), et surtout un développement très important de la microflore adaptée à la biodégradation des hydrocarbures. Celle-ci représente généralement moins de 1% de la population totale d'un sol non pollué (environ 10^2 bactéries/g de terre). Dans un sol pollué, la microflore adaptée atteint des valeurs de 10^5 à 10^7 bactéries/g.de terre, soit jusqu'à plus de 30% de la microflore totale.

Ces résultats sont en accord avec ceux que l'on trouve dans la littérature (DAVIS, 1976; JONES et coll., 1970; CAMPBELL et coll., 1972).

L'emploi d'un produit apportant l'azote et le phosphore complémentaire au carbone des hydrocarbures (S320) accentue ce phénomène, et accroît de façon très sensible le développement de la microflore adaptée, ce qui doit permettre d'augmenter le taux de biodégradation.

Il est important de remarquer que les souches capables d'assimiler les hydrocarbures sont présentes, à l'état latent, dans le sol. Il semble donc préférable, pour accélérer l'épuration

d'un sol, d'apporter à cette microflore spécialisée les éléments nutritifs pouvant lui faire défaut, plutôt que d'essayer de sélectionner des souches particulièrement actives. Nous pensons, en effet, que cette sélection se fait naturellement, à partir de la microflore présente, en fonction des conditions physico-chimiques et de la nature de la pollution.

Ceci a été vérifié par les travaux de laboratoire qui ont montré que l'on obtenait des souches adaptées (inoculum) par simples cultures d'enrichissement ayant pour origine un sol pollué (cf.2.2.4 et 2.3.1, voir aussi l'influence de la température et du pH : 4.3.3. et 4.3.4.).

5.2. INFLUENCE D'UN EPANDAGE D'HYDROCARBURES SUR LA FLORE PHANEROGAMIQUE.

5.2.1. Généralités.

Le but de l'épuration biologique est d'obtenir, au bout d'un certain temps, un sol ayant retrouvé, autant que faire se peut, ses propriétés et ses qualités initiales.

En particulier, un sol épuré doit être capable de permettre une croissance normale de la flore phanérogamique.

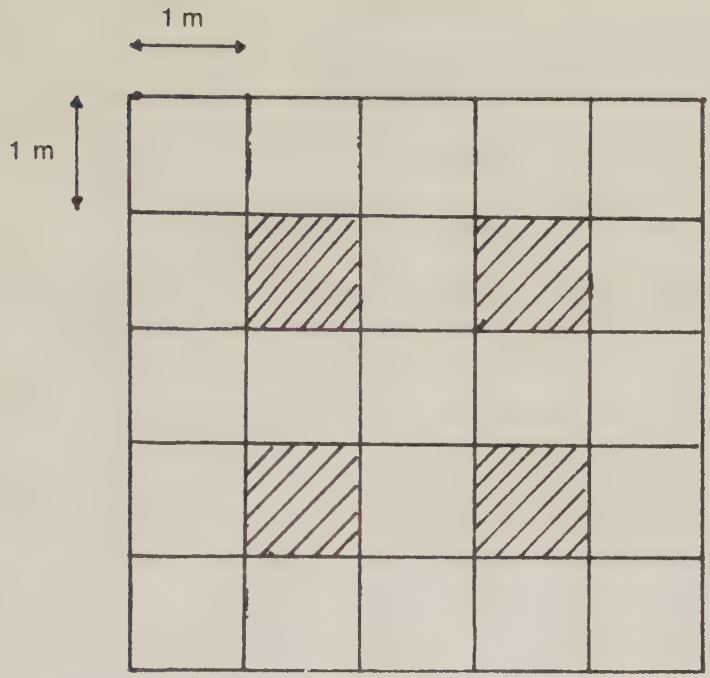
Des observations ont donc été faites sur le terrain de la Courneuve où l'on avait épandu, à diverses concentrations, des résidus d'hydrocarbures traités au S320 (voir 5.1.2.1.). On a étudié, dix mois après l'épandage, la répartition et la croissance de la flore sur les différentes parcelles.

Rappel.

Parcelle 1 : 50% mélange hydrocarbure S320-50% eau
Parcelle 2 : 50% " " " -75% "
Parcelle 3 : 50% " " " -100% "
Parcelle 4 : Sol témoin non pollué

5.2.2. Protocole expérimental

Sur chaque parcelle, on a délimité 4 surfaces de $1m^2$ chacune



Sur chacune de ces surfaces, on a réalisé l'étude quasi-exhaustive de la flore présente. 6 plantes ou familles de plantes représentant plus de 90% de la population ont été étudiées suivant deux critères :

1 - Nombre d'individus au m^2 de chaque espèce

2 - Hauteur moyenne de l'espèce considérée

5.2.2.1. Identification des plantes

Les 6 plantes retenues ont été ainsi identifiées (Nouvelle flore de BONNIER et DE LAYENS).

Plante 1 : Composées, Séneçon Senecio

Plante 2 : Papilionacées, Lotées, Luzerne Medicago sativa

Plante 3 : Composées, Achillée Mille feuille Achillea Millefolium

Plante 4 : Composées, Chicoracées, Porcelle Hypochoeris (voisin du Pissenlit)

Plante 5 : Ombellifères, Daucus Carotte Daucus Carotta

Plante 6 : Graminées en général, sans identification d'espèces

Tableau 5.7 : Flore phanérogamique des terrains de la Courneuve

		Témoin sol non pollué	Parcelle I: 50-50	Parcelle 2: 50-75	Parcelle 3 : 50-I00
Senecio	N	8,8	0	I,3	I,4
	H	62,5	-	78	50
	X	550	-	IOI,4	70
Medicago s:	N	II,5	2	3,8	I8,8
	H	84,I	-	85	52
	X	967	-	323	977
Achillea m,	N	62,5	I	59	43
	H	64	-	74	65,5
	X	4000	-	4366	28I6
Hypochoeris:	N	5,8	I	2,3	2,8
	H	-	-	-	-
	X	-	-	-	-
Daucus c.	N	0	0	3,5	I,2
	H	-	-	II5	IIO
	X	-	-	402,5	I32
Graminées	N(%)	30(%)	40(%)	60(%)	20(%)
	H	I5	I7	25	I4
	X	450	680	I500	280

N : nombre d'individus au m^2

H : hauteur moyenne

X : produit N H

Dans le cas des graminées, on exprime la surface au sol occupée en % de la surface totale.

5.2.2.2. Dénombrement des plants

Pour chaque parcelle, on a recueilli la totalité des plantes 1,2 et 3. Le nombre moyen de chaque espèce au m^2 est égal au quart du total des plants prélevés par parcelle et par espèce considérée.

5.2.2.3. Hauteur moyenne

Pour chaque espèce, on a mesuré 30 plants pris au hasard sur chaque parcelle ou on a calculé la moyenne de tous les plants recueillis, si leur nombre était inférieur à 30.

La distribution des hauteurs s'établit ainsi :

- Plante 1 :	$H_1 \pm 0,1\ H_1$	représente	45 %	de la population 1
	$H_1 \pm 0,2\ H_1$	"	85%	" " "
- Plante 2 :	$H_2 \pm 0,1\ H_2$	"	55 %	" " 2
	$H_2 \pm 0,2\ H_2$	"	89 %	" " "
- Plante 3 :	$H_3 \pm 0,1\ H_3$	"	70%	" " 3
	$H_3 \pm 0,2\ H_3$	"	97%	" " "

5.2.3. Résultats : Voir tableau 5.7, p 106

5.2.4. Interprétation.

On peut faire les remarques suivantes :

- La croissance de Senecio est sensiblement ralentie sur les parcelles polluées, avec inhibition totale dans la parcelle 1 (forte pollution).

- Le cas de Medicago (Luzerne) est intéressant. On note en effet, dans la parcelle 3, que si la hauteur moyenne des plants est sensiblement inférieure dans la parcelle polluée, le nombre de plants au m^2 est plus élevé. Il en résulte que, globalement, la quantité de luzerne présente est sensiblement égale à celle obtenue sur le sol témoin (Les coefficients sont comparables). Ce fait est important à signaler, vu l'intérêt agricole de cette espèce.

- La croissance d'Achillea M, semble peu affectée par le traitement.

- On trouve environ deux fois moins d'Hypochoeris sur les parcelles polluées et traitées.

- En revanche, on trouve sur les parcelles 2 et 3 les Ombellifères Daucus C. que l'on ne trouve pas sur le sol témoin.

- La croissance des Graminées (herbe) est irrégulière. Il semble, cependant,qu'elle soit favorisée sur les parcelles traitées.

5.2.5.Discussion des résultats et conclusions.

- Sur la parcelle 1, fortement polluée, la flore n'est pas rétablie, à l'exception des Graminées dont la croissance est comparable à celle du sol non pollué.

- Dans les parcelles 2 et 3, on peut considérer que l'équilibre est presque réalisé, en particulier en ce qui concerne la croissance de la luzerne. On note la présence d'espèces absentes sur le sol témoin (Daucus C.), alors qu'aucune espèce n'a disparu par rapport au sol non pollué.

- On peut donc considérer qu'au bout de 10 mois, le processus d'épuration est presque terminé, au moins au regard des indications données par la croissance de la flore sur les parcelles 2 et 3.

- D'autre part, l'épandage ne doit pas entraîner une concentration trop élevée d'hydrocarbures dans le sol (*).

Ce fait a déjà été signalé par plusieurs auteurs (STREBBINGS, 1970). BAKER (1970)(**), a noté qu'en cas de forte pollution, la germination et la croissance de la flore étaient fortement ralenties, mais qu'en cas de faible pollution, la croissance, après une phase de latence, redevenait normale, voire même supérieure à celle des sols témoins. Il semblerait que la concentration maximum admissible s'établisse aux alentours de 5% du poids de sol sec.

(*)- Dans cette expérience, il a été épandu environ 80 kg/m^2 de mélange hydrocarbure.-S320 sur la parcelle 1 (croissance inhibée), 50 kg/m2 sur la parcelle 2 et 30 kg/m2 sur la parcelle 3.

(**)- La toxicité des hydrocarbures, variable suivant les espèces de plantes, s'accroît des paraffines aux naphténiques et des oléfines aux aromatiques.

CONCLUSION GENERALE

On a pu montrer qu'il existe, à l'état latent, des souches de microorganismes aptes à la biodégradation des hydrocarbures, aussi bien dans les sols qu'en eaux de surface.

Le nombre, la variété, l'ubiquité des bactéries, joints à leur faculté d'utiliser, directement ou par cooxydation, nombre de composés organiques (et en particulier les hydrocarbures) comme source de carbone et d'énergie, expliquent ce fait.

Ce processus met en cause de nombreuses espèces bactériennes dont l'action est concomitante ou successive. On a isolé des souches actives vis-à-vis des hydrocarbures appartenant aux genres : Pseudomonas (particulièrement Ps. aeruginosa et Ps. fluorescens), Micrococcus, Enterobacter, Arthrobacter, Bacillus et Acinetobacter.

Il est bien établi que les souches actives se sélectionnent naturellement à partir de la microflore présente dans le biotope considéré, en fonction des conditions physico-chimiques du milieu et de la nature de la pollution.

Dans l'application pratique, il semble plus facile de modifier certains paramètres du milieu, ce qui permet à une grande partie de la population microbienne présente d'être plus active, que de tenter de maintenir une très haute activité de souches pures isolées en laboratoire.

Des comparaisons de biodégradation entre un inoculum provenant de sols pollués et un inoculum commercial ont vérifié le bien-fondé de cette hypothèse.

On a montré que les facteurs les plus importants concernent les besoins en compléments nutritionnels de la microflore adaptée aux hydrocarbures, ces derniers représentant la source de carbone et d'énergie. On a en particulier mis en évidence l'importance de l'azote, du magnésium et du phosphore. L'intérêt des produits additifs F72 et S320 est d'apporter, sous forme assimilable et restant liée aux hydrocarbures, des facteurs dont la carence peut être limitante en milieu naturel, principalement l'azote.

En laboratoire* et en 21 jours, à 30°C, l'évaporation (en étuve fixe) d'un ml de pétrole brut de Kuweit (0,8510g) s'élève en moyenne à 0,25g soit 29% du poids initial.

La biodégradation naturelle en milieu synthétique complet (avec nitrate d'ammonium) atteint 0,18g (soit 30% du résidu après évaporation) et 0,31g (soit 1,8 fois plus) avec les additifs F72 et S320 (48% du résidu).

En milieu carencé en azote (sans NO_3NH_4), la biodégradation sans additif n'est plus que de 0,012g (2% du résidu). La biodégradation avec F72 atteint 0,13g, soit 100 fois plus (20% du résidu), et 0,17g, soit 150 fois plus (27% du résidu) avec S320.

Ces résultats sont confirmés par les essais sur le sol qui ont montré que le traitement d'un sol pollué par des produits apportant l'azote et le phosphore, sous une forme assimilable, accroît de façon hautement significative la microflore adaptée aux hydrocarbures, ce qui semble entraîner un taux d'assimilation plus élevé.

Le pH ne semble pas jouer un rôle particulièrement déterminant, au moins dans la gamme des valeurs rencontrées couramment en milieu naturel. Cependant, les souches adaptées sont différentes suivant que le milieu est acide (levures, champignons) ou neutre ou basique (bactéries). Il sera donc généralement peu utile de vouloir modifier le pH d'un milieu.

On a par contre mis en évidence la très grande influence de la température. La biodégradation maximum se situerait aux environs de 35°C. Il est cependant difficile d'envisager de modifier les conditions de température d'un milieu naturel donné.

On a également noté que, dans les cas étudiés, l'apport forcé d'oxygène ne paraît pas avoir l'importance qu'on lui accorde généralement. On peut émettre l'hypothèse que, si une aération forcée est nécessaire dans le cas de fermentation industrielle d'hydrocarbures légers de type paraffine (oxydation rapide), il semble par contre que dans le cas d'une épuration biologique en milieu naturel les échanges gazeux avec l'atmosphère soient suffisants dans la mesure où le rapport hydrocarbures/eau ne serait pas excessif. En effet, le phénomène est alors plus lent.

---

* Valeurs moyennes.

Les essais sur le sol ont également montré, par l'analyse de la flore phanérogamique, que l'épuration ne se produit dans des conditions favorables que si la concentration des hydrocarbures n'est pas trop élevée (maximum environ 5% par rapport au sol sec, soit 30 kg hydrocarbures/m^2).

Ceci peut être rapproché de l'influence de l'aération. En effet, la biodégradation n'est réellement efficace qu'en conditions d'aérobiose, soit la couche superficielle du sol. On peut émettre l'hypothèse qu'une concentration d'hydrocarbures trop élevée peut entraîner, de par son action physique sur la texture du sol, une asphyxie de celui-ci par limitation des échanges gazeux.

La technique retenue de dosage des hydrocarbures consommés est celle de la pesée des résidus après évaporation à l'obscurité du solvant (chloroforme). Cette méthode permet une estimation quantitative relativement précise, et en tout cas reproductible, de l'évaporation et de la biodégradation, sous réserve d'un nombre de répétitions suffisant.

On a en effet montré l'intérêt des méthodes statistiques qui permettent d'obtenir des résultats fiables et qui devraient être étendues à toutes mesures de ce type. On peut remarquer que, dans certains cas, on aurait pu obtenir,en réalisant une seule mesure,des résultats inverses de ceux qui furent obtenus de façon hautement significative par la méthode statistique .

Nous n'avons pas la prétention d'avoir étudié tous les aspects de ce phénomène, qui fait intervenir des mécanismes d'une extrême complexité.

Il serait, par exemple, intéressant d'étudier plus précisément la composition des microflores actives à diverses températures, ainsi qu'à différents pH.

De même, une analyse détaillée du devenir des hydrocarbures dans le sol, ainsi que des voies métaboliques et des enzymes qui y sont attachées, apporteraient des éléments d'information supplémentaires qui permettraient une meilleure compréhension du phénomène.

Il est cependant hors de doute, et le nombre de publications à ce sujet en fait foi, que la dégradation des hydrocarbures par voie biologique est une solution à la fois élégante et efficace, donc que nous souhaitons d'avenir, pour résoudre le problème de la pollution par des hydrocarbures en les réintégrant dans le cycle naturel.

BIBLIOGRAPHIE

ABBOTT,B.J. et GLEDHILL, W.E. (1971) - The extra cellular accumulation of metabolic products by hydrocarbon degrading microorganisms. Adv. Appl. Microbiol., 14, 249-288

ANTONIEWSKI,J. et SCHAEFFER, R. (1972)- Recherches sur les réactions des coenoses microbiennes de sols imprégnés par des hydrocarbures. Modification de l'activité respiratoire. Ann. Inst. Pasteur, 123, 805-819.

ARENSHTEIN, A.M. (1961)- Role of Azotobacter in the biological purification of petroleum waste waters. Mikrobiologiya, 30, 304-307.

ATLAS, R.M. et BARTHA,R.(1972)- Dégradation and mineralization of petroleum by twobacteria isolated from coastal waters. Biotechn. Bioeng. 14 (3), 297-308.

ATLAS,R.M. et BARTHA,R. (1973)- Abundance, distribution and oil biodegradation potential of microorganisms in Raritan bay. Environmental pollution. Appl. Sc. publishers 4 (4), 291-299.

AZOULAY,E. (1966)- Métabolisme microbien des hydrocarbures paraffiniques à chaîne droite. Thèse de Doctorat Sciences Physiques. Université Aix-Marseille.

BAKER, J.M. (1970 - The effects of oils on plants. Environmental pollution 1 (1), 27-41.

BARNHART et KEHBERGER (1970) - The ability of biological systems to assimilate oils. Proceed A-P-I (Div. Refin), 436-465.

BARUAH, J.N .; ALROY, Y. et MATELES, R.I. (1967) - Incorporation of liquid hydrocarbons into agar media. Appl. Microbiol., 15, 961.

BEERSTECHER, E (1954) - Petroleum microbiology - Elsevier. Amsterdam

BOGDANOVA, V.M. (1966) - Physiological properties of microorganisms isolated in an atmosphere of methane and propane. Mikrobiologiya,35, 234-241.

BONNIER,G. et DE LAYENS,G. - Nouvelle Flore. Librairie générale de l'enseignement. Paris

BREED, R.S.; MURRAY, E.G. et SMITH, N.R. (1957)- Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 7 th edition. Williams & Wilkins-Baltimore.

BRIDIE et BOS (1971)- Biological degradation of mineral oil in sea water. J. Inst. Petr.,57, 270-277.

BRISOU,J. (1965)- Techniques d'enzymologie bactérienne. Masson.Paris

BUSHNELL, L.D.; HAAS,H.F. (1941) - The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. J. Bact., 41, 653-673.

BUTTIAUX, R; BEERENS, H. et TACQUET, A. (1966)-Manuel de techniques bactériologiques. Ed. Med. Flammarion. Paris

BUTTNER, H. (1926) - Zur Kenntnis der Mykobacterien, insbesondere ihres quantitativen Stoffwechsel auf Paraffin-nahnboden. Arch. Hyg. Bakteriol., 97, 12-27

CAMPBELL, W.B.; HARRIS, R.W. et BENOIT,R.E. (1972)- Experimental response of Alaskan tundra microflora to an experimental crude oil spill. Abstr. A. Meet. Am. Soc. Microbiol. 23-28. Abstr. nºE 15. Apr. 1972.

CHURCHILL, A.V. (1963)- Microbial fuel tank corrosion. Mechanisms and contributory factors. Materials protection, June 1973, 19-23.

COONEY, J.J. et KULA, J.J. (1970)-Growth and survival of organisms isolated from hydrocarbon fuel systems. Int. Biodeterioration.Bull., 6(3), 109-114.

COTY, V.F.; GORRING, R.L.; HEILWELL, I.J.; LEAVITT, R.I. et SRINIWASAN (1971) - Growth of microbes in an oil-Continuous environment. S. Biotechn. Bioeng., 13 (6), 825-842.

DAVIES, J.A. et HUGUES,I. (1968)- The biochemistry and microbiology of crude oil in biodégradation. In Symp. Biol. effects oil poll. 139-144.

DAVIS, J.B. (1967)- Petroleum microbiology. Elsevier. Amsterdam

DOBSON, A.L. et WILSON, H.A. (1964)- Respiration studies on soil treated with some hydrocarbons. Soil. Sci. Soc. Am. Proc., 28, 536-541.

DOMMERGUES, Y. et MANGENOT,F. (1970)- Ecologie microbienne du sol. Masson.

DOUROS, J.D. et FRANKENFELD, J.W. (1968)- Oxidation of alkyl-benzenes by a strain of Micrococcus cereficans growing on n-paraffins. Appl. Microbiol., 16, 532-533.

EDMONDS, P. et COONEY, J.J. (1967)- Identification of microorganisms isolated from jet fuel systems. Appl. Microbiol., 15, 411-416.

EHRHARDT,M. et BLUMER,M. (1972)- The source identification of marine hydrocarbons by gas chromatography. Environmental poll. Appl. Sc., 3 (3), 179-193.

ERTOLA,R.J.; MAZZA,L.A.; BALATTI, P.A. et SEGOVIA,R.F.(1969)- Gas oil utilization by a Micrococcus strain. J.Ferm.Techn., 47 (9), 536-541.

FORRO, J.R. (1966)- The microbial oxidation of toluene. Dissert. Abstr. 26, 6305.

FOSTER, J.W. (1962)- Hydrocarbon as substrates for microorganisms. J. Microbiol. Serol., 28, 241-274.

FREDERICKS, K.M. (1966)- Adaptation of bacteria fromone type of hydrocarbon. Nature. 209, 1047.

FUKUI,S. et TANAKA, A. (1968)- Formation of vitamins and coenzymes by hydrocarbon fermentation. Hakho Kyokaishi, 26, 209-218.

FUSEY,P.; GONI,J.; LACAZE,J.C.; PRIOU,M.L.; LAMIDEY,J. et RUDALI,G.(1969)- Elimination des déchets pétroliers par un produit sans action nocive pour la flore et la faune aquatique. C.R.Acad.Sc. Paris, 269, 2435-2438.

FUSEY,P. et OUDOT,J. (1973)- Note sur l'accélération de la biodégradation d'un pétrole brut par les bactéries. Material und organismen. 8, H.2, (157-164).

FUSEY,P.; LAMPIN, M.F. et OUDOT,J. (1975)- Recherches sur l'élimination des hydrocarbures par voie biologique. Material und Organismen. (sous presse).

GATELLIER, C.R. (1970)- Les facteurs limitant la biodégradation des hydrocarbures dans l'épuration des eaux. Centre de perfectionnement technique. Comm. 9,10,11 Déc. 1970.

GIBSON,D.T.; WOOD,J.M.; CHAPMAN,P.J.(1967)- Bacterial degradation of aromatic compounds. Biotechn. Bioeng., 9, 33-34.

GONTCHAROFF,N. (1971)- Clé d'identification des bactéries hétérotrophes. Dunod. Paris

GRAY, PH. H. et THORNTON,H.G. (1928)- Soil bacteria that decompose some aromatic compounds. Zent. Bakt. Parasitenk. Infek.II, 74-96.

HAAS, H.F.; YANTZI, M.F. et BUSHNELL C.D.(1941)- Microbial utilization of hydrocarbons. Trans. Kansas. Ac. Sc., 44, 39-95.

HAAS, H.F. (1942)- The bacterial utilization of petroleum products and the production of carotenoids pigments. Thesis Kansas State College.

HARRIS, J.O. (1966)- Asphalt oxidizing bacteria from soil. Ind. Eng. Chem., 58, 65-69.

HAZZARD, G.F. (1967)- The detection of microorganisms in petroleum products. J. Inst. Petr., 53 (524), 267-274.

HEDRICK, H.G.; CARROLL, M.T.; OWEN, H.P. et PRITCHARD,D.J. (1963)- Viability of selected microorganisms in hydrocarbon fuels. Appl. Microbiol., 11, 472-475.

HEDRICK, H.G.; REYNOLDS,R.J. et CRUM, M.G. (1968)- Identification and viability of microorganisms from jet fuel samples. Dev. Ind. Microbiol., 9, 415-425.

HERINGA, J.W.; HUYBREGTSE, R. et VAN DER LINDEN, A.C. (1961)- n-Alkane oxydation by a Pseudomonas. A. Van Leeuwenhoek. J. Microbiol. Serol., 27, 51-58.

HILL, E.C.; DAVIES, I.; PRITCHARD,J.A. et BYRON, D. (1967)- The estimation of microorganisms in petroleum products. J. Inst. Petr.,53, 275-279.

HILL, E.D. (1969)- Bacteriol. Proc. 3, 3.

HUMPHREY, A.E. (1967)- A critical review of hydrocarbons fermentation and their industrial utilization. Biotechn. Bioeng. 9,3.

JOBSON, A; COOK,F.D. et WESTLAKE, D.W.S. (1972)- Microbial utilization of crude oil. Appl. Microbiol., 23 (6), 1082-1089.

JOHNSON, M.J. (1964)- Utilization of hydrocarbons by microorganisms. Chem. Ind., 36, 1532-1537.

JONES, J.G.;KNIGHT, M. et BYRON, J.A. (1970)- Effect of gross pollution by kerosine hydrocarbons on the microflora of Moorland soil. Nature, 227, 1166.

KALLIO, R.E. (1969)- In. Fermentation Advances. Ed. Perlman. D. Acad. Press. Inc., N.Y., p.635.

KATSUHIKO, F.; SHOICHI,S. et SABURO,F. (1966)- Production of vitamin B12 using several kinds of bacteria in hydrocarbon media. Hakko Kogaku Zasshi, 44, 185-191.

KESTER, A.S. (1961)- Studies on the oxidation of hydrocarbons by microorganisms. Thesis. Un of Texas Diss. Abst.22.

KLEIN, D.A. (1968)- Growth of an aquatic-derived bacterium in the presence of long chained alkanes. Appl. Microbiol., 16, 421-422.

KLUG, M.J. et NARKOVETZ, A.J. (1967)- Olefin oxidation by the genus Candida. 154th A.C.S. Nat. Meet. Chicago, Abst. paper Q6.

KNILL, M.W.(1970)- Oil pollution of a Greensand source. J.Inst. of water engineers, 24 (7), 414.

KOUPENOV, L.G. (1969)- Isolement et étude de bactéries oxydant les hydrocarbures avec fixation d'azote moléculaire. I.F.P. Publication nº 160984.

KRASIL'NIKOV, N.A.; STEPANOVA, L.N.; KORONELLI,T.T. et DUDA,V.I.(1&71)- A new species of paraffin oxidizing Mycobacterium. Mikrobiologiya, 40,(6), 1040-1045.

KRYNITSKY, J.A. et McLAREN,G.w.(1962). Some effects of microbial growths on surfactant properties of fuels. Biotechn. Bioeng., IV (4), 357-366.

KURITA,S.; ENDO,T.; NAKAMURA,H.; YAGI,T. et TAMIYA,N. (1971)- Decomposition of some organic sulfur compounds in petroleum by anaerobic bacteria. J. Gen. Appl. Microbiol., 17, 185-198.

KUSUNOSE, M.; ICHIHARA,K.; KUSUNOSE,E.; NOSAKA,J. et MATSUMOTO,J.(1967)- The possible role of flavin on the hydroxylation of hydrocarbons by bacterial enzyme system. Agric. Biol. Chem., 31, 990-992.

LA RIVIERE, J.W.M. (1955)- The production of surface active compounds by microorganisms and its possible significance in oil recovery. A. Van Leuwenhoek, J. Microbiol. Serol., 21, 1-8.

LAROCK, P.A. et SEVERANCE, M.M. (1972)- Kinetics of bacterial growth in a hydrocarbon. Abst. A. meet. Am. Soc. Microbiol. 72 nd. Pa.; Apr. 1972, NºE 16.

LEAVITT, R.I.(1966)- Enzymatic oxidation of n. decane by a species of Achromobacter. Bact. Proc., 19, 7.

LISON, L.(1968)- Statistiques appliquées à la biologie expérimentale. Gauthier-Villars. Paris

Mc CALLA, T.M.(1950)- Studies on the effect of micro organisms on rate of percolation of water through soils. Soil Sci. Am. Proc., 15, 182-186.

Mc KENNA, E.J. et KALLIO, R.E. (1965) - Ann. Rev. Microbiol., 19, 183

MAKULA, R. et FINNERTY, W.R. (1968)- Microbial assimilation of hydrocarbons. II. Fatty acids derived from 1- alkenes. J. Bact.,95, 2108-2111.

MESHKOV,A.N. (1958)-The use of the direct bacterial count in studying oil microflora. Mikrobiologiya, 27, 390-392.

MIGET, OPPENHEIMER, KATOV, LAROCK (1969)- - Microbial degradation of n-paraffin hydrocarbons in crude oil. A.P.I. F.W.P.C.A. Prev. et curt. of oil spills (327-331).

MILKO, E.S. et RABOTNOVA, I.L. (1967)- Synthesis of B12 vitamin by mycobacteria on the hexadecane containing medium. Pribl. Biokhim. Mikrobiol., 3, 277-282.

MOHRAN, E. (1972)- Microscopic organisms hold promise for oil slicks. The oil et gas journal ESSO, 28 fév. 1972. 52-53.

MULLAKHANBHAI, M.F. et BHAT, J.V. (1966)- The degradation of aromatic compounds by Arthrobacter species. Curr. Sc., 35, 58-59.

NISSEN, T.Y.(1970)- Biological degradation of hydrocarbons with special reference to soil contamination. T. Planteavl., 74, 391-405.

NYNS, E.J. (1966)- Valorisation de la biologie des hydrocarbures. Rev. ferm. et ind. alim., 22, 115-119; 22, 150-157.

NYNS, E.J. et WIAUX, A.L. (1968)- Biologie des hydrocarbures. Agricultura XVII (2), 12-56.

OSNITSKAYA, L.K.(1946)- Bacterial decomposition of hydrocarbons. Mikrobiologiya, 15, 249-263.

PAUSHKIN, Y.M. - Effects of salts of higher carboxylic acid on the growth of microorganisms in an oil containing medium. Pribl. Biokhim. Microbiol., 6, (6), 728-731.

PERRY, J.J. et SCHELD, H.W. (1968)- Oxidation of hydrocarbons by microorganisms isolated from soil. Can. J. Microbiol., 14, 403-407.

PERTSOVSKAYA, A.F. et EROSHIN, V.K. (1967)- Vitamin B12 formation by paraffin oxidizing mycobacteria. Pribl. Biokhim. Mikrobiol., 3, 50-54.

PHILLIPS, U.A. et TRAXLER, R.W. (1963)- Microbial degradation of asphalt. Appl. Microbiol., 11, 235-238.

PILPEL, N. (1968)- The natural fate of oil in the sea. Endeavour,27, 11-13

POCHON, J. et TARDIEUX,P.(1962)- Techniques d'analyses en microbiologie du sol. Ed. de la Tourelle. Paris

RAHN, O. (1906)- Ein Paraffin zersetzender Schimmelpilz. Zentr. Bakteriol. Parasitenk., Abst.II, 16, 382-384.

RAISBECK, J.M.(1972)- Some studies on the migration and microbial degradation of mineral oils in soil. Thesis. Stichting Concawe, The Hague, 2012.

RAYMOND, R.L.(1961)- Microbial oxidation of n-paraffinic hydrocarbons. Dev. Ind. Microbiol., 8, 329-334.

REISFELD,A.; ROSENBERG,E.; GUTNICK,D. (1972)-Microbial degradation of crude oil : factors affecting the dispersion in sea water by mixed and pure cultures (Arthrobacter). Appl. Microbiol., 24(3), 363-368.

RIVIERE,J.; OUDOT,J.; JONQUERES,J. et GATELLIER,G.(1974). Fixation d'azote atmosphérique par des bactéries utilisant l'hexadécane comme source de carbone et d'énergie. Ann. Agron., 25 (4), 633-644.

ROGOFF, M.H.(1962)- Chemistry of oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by soil Pseudomonads. J. Bact., 83, 998-1009.

ROZANOVA, E.P. (1967)- Utilisation des hydrocarbures par les microorganismes. USP. Mikrobiol. S.S.S.R., 4, 61-96.

SABINA, L.R. et PIVNICK, H. (1956)- Oxidation of soluble oil emulsions by Ps. oleovorans and Ps. formicans. Appl. Microbiol., 4,171-175.

SAMTSEVICH,S.A.(1955)- Seasonal aspects and periodicity in the development of soil microorganisms. Mikrobiologiya, 24, 615-625.

SENEZ, J.C. et KONOVALTSCHIKOFF-MAZOYER,M.(1956). Formation d'acide dans les cultures de Ps. aeruginosa sur n-heptane. Compte rendu Acad. Sc., 242, 2873-2875.

SENEZ,J.C.(1968)- Microbiologie générale. Doin. Paris

SHARPLEY, J.H. (1966)- Elementary petroleum microbiology. Gulf publishing Co. Houston _ Texas

SIMAKOVA,T.L. et all.(1968)- Metabolism of high paraffin oil by microorganisms under anaerobic and aerobic conditions. Mikrobiologiya, 37,233-238.

SOHNGEN, N.L.(1906)- Über Bakterien, welche Methan als Kohlens toffnahrung Energiequelle gebranchen. Zentr. Bakteriol. Parasitenk., Abt.II, 15, 513-517.

SÖHNGEN,N.L.(1913)- Benzine, Petroleum, Paraffinol und Paraffin als Kohlenstoff und Energiequelle für Mikroben. Zentr. Bakteriol. Parasitenk. Abt.II, 37, 595-609.

SOLI, G. (1973)- Selective substrate utilization by marine hydrocarbonoclastic bacteria. Biotechn. Bioeng., 15,(2), 285-297.

SOUMARE,S. et BLONDEAU, R.(1972)- Milieux pour l'étude de la microflore bactérienne du sol. Ann. Inst. Pasteur, 123, 239-249.

STEVENSON,I.L. (1967)- Utilization of aromatic hydrocarbons by Arthrobacter species. Can. J. Microbiol. 13, 205-211.

STEWART, J.E.(1959)- Bacterial hydrocarbon oxidation. I. Oxidation of n-hexadecane by a gram-negative coccus. J.Bacteriol., 78, 441-448.

STONE,R.W.; WHITE, A.G.C. et FENSKE, M.R.(1940)- Microorganisms attacking petroleum and petroleum fractions. J. Bacteriol. 39, 91-92.

STONE, R.W.; FENSKE, M.R. et WHITE, A.G.C.(1942)- Bacteria attacking petroleum and oil fractions. J. Bacteriol., 44, 169-178.

STRAWINSKI, R.S. et STONE, R.W.(1940)- The utilization of hydrocarbons by bacteria. J. Bacteriol., 40, 461.

STREBBINGS, R.E.(1970)- Recovery of salt marsh in Brittany sixteen months after heavy pollution by oil. Environmental pollution. Elsevier 1 (2), 163-167.

TAKAHASHI, J.; KOBAYASHI,K., IMADA,Y. et YAMADA,K.(1965)- Effects of corn steep liquor and thiamine on L-glutamic acid fermentation of hydrocarbons. Appl. Microbiol., 13, 1-4.

TANT,C.O. et BENNETT, E.D.(1956)- The isolation of pathogenic bacteria from used emulsion oils. Appl. Microbiol., 4, 332-338.

TATTERSFIELD,F. (1972)- The decomposition of naphtalene in the soil and the effect upon its insecticidal action. Ann. Appl. Biol., 15, 57-79.

TAUSSON, W.O. (1925)- Zur Frage ueber Assimilation des Paraffins durch-Mikroorganen. Biochem.Z.; 155, 356-368.

TAUSZ, J. et PETER,M.(1919)-Neue Methode der Kohlenwasserstoffeanalyse mit Hilfe von Bakterien. Zentr. Bakteriol. Parasitenk., Abt.II, 49,479-554.

THIJSSE, G.J.E. et VAN DER LINDEN,A.C.(1958)- n-Alkane Oxidation by a Pseudomonas. Studies on the intermediate metabolism. A. van Leuwenhoek, J. Microbiol.Serol., 27, 171-179.

TRAXLER,R.W. (1966)- Bitumen attack by microroganisms. Ind. Eng.Chem., 58, 59-64.

TRAXLER, R.W. et BERNARD,J.M.(1969)- The utilization of n-alkanes by Pseudomonas aeruginosa under conditions of anaerobiosis. Int. Biodetn. Bull. 5 (1), 21.

TRECCANI, V. (1963)- Microbial. degradation of hydrocarbons. Prog. Ind. Microb., 4, 2-33.

TSUBOI,T.; SEKIJO,C. et SHOJI,O.(1966)- Production of biotin by microorganisms. Agr. Biol. Chem., 30, 1238-1246.

VAN DER LINDEN, A.C. et THIJSSE, G.J.E. (1965)- The mechanisms of microbial oxydation of petroleum hydrocarbons. Adv. Enzymol., 270, 469.

VAN EYCK,J. et BARTELS,T.J. (1970)- Paraffin oxidation in Pseudomonas aeruginosa. J. Bact., 104 (3), 1065-1073.

WAGNER,F.; ZAHN,W. et BUEHRING,U. (1967)- Bacterial cell yields on various hydrocarbons. 154 th A.C.S. Nat. Mett. Chicago, sept. Paper Q2.

ZAJIC, J.E. et SUPPISSON, B.(1972)- Emulsification and degradation of "Bunker C" fuel oil by micro organisms. Biotechn. Bioeng.,XIV (3) 331-343.

ZAJIC,J.E.;SUPPLISSON,B et VOLESKY,B. (1974). Bacterial degradation and emulsification of n°6 fuel oil. Environnement, Sciences et Techniques, 8, 664-669.

ZITKO,J. et EARSON,W.V.(1970)- The characterization of petroleum oils and their determination in the aquatic environment. F.R.B. Canada Technical report n°217.

ZOBELL, C.E. (1945)- The role of bacteria in the formation and transformation of petroleum hydrocarbons. Science, 102, 364-369.

ZOBELL, C.E.(1950)- Assimilation of hydrocarbons by microorganisms. Adv. in Enzymology, 10, 443-486.